

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Química

Amanda Barbosa Lima

**DETERMINAÇÃO DE VERAPAMIL E OXCARBAZEPINA EM AMOSTRAS DE
URINA E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR AMPEROMETRIA PULSADA
EM FIA**

DIAMANTINA - MG

2016

Amanda Barbosa Lima

**DETERMINAÇÃO DE VERAPAMIL E OXCARBAZEPINA EM AMOSTRAS DE
URINA E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR AMPEROMETRIA PULSADA
EM FIA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos

DIAMANTINA - MG

2016

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário

Confeccionada pelo Sisbi/UFVJM

Amanda Barbosa Lima

**DETERMINAÇÃO DE VERAPAMIL E OXCARBAZEPINA EM AMOSTRAS DE
URINA E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR AMPEROMETRIA PULSADA
EM FIA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos

Data de aprovação ____/____/____.

Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos
Departamento de Farmácia – UFVJM

Profª. Dra. Andréa Renata Malagutti
Departamento de Farmácia - UFVJM

Prof Dr. Lucas Franco Ferreira
Instituto de Ciência e Tecnologia- UFVJM

Diamantina-MG

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos a todos que me apoiaram durante esse percurso, e tornaram possível a concretização deste trabalho. Em particular, gostaria de agradecer:

- ✓ A Deus pela vida e por me manter firme na caminhada em busca dos meus sonhos.
- ✓ Aos meus pais, Clemência e Hélio, pelo amor, dedicação, confiança, ensinamentos, e por não medirem esforços para que eu alcance meus objetivos.
- ✓ Aos meus irmãos, Aline, Amélia e Alan, pela amizade e por sempre me ajudarem nessa etapa, cada um da sua forma.
- ✓ Ao Rubens, por todo o carinho, dedicação e por deixar meus dias mais leves. Agradeço também a sua família.
- ✓ Aos meus amigos e familiares que torceram por mim nessa etapa, em especial à Daiana, Fernanda, Poliana e Larissa.
- ✓ Ao meu orientador, Wallans, pela orientação durante todo esse tempo, por contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional e pela paciência e amizade.
- ✓ A todos os colegas e amigos de laboratório que ajudaram durante este percurso, em especial a: Tiago, Morgana, Fernando e Dani, por todas as experiências laboratoriais e de vida compartilhadas.
- ✓ À banca examinadora composta pelos professores Dra. Andréa Renata Malagutti, e professor Dr. Lucas Franco Ferreira por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.
- ✓ À Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, em especial ao departamento de Química, pela estrutura e oportunidade de realização deste trabalho.
- ✓ À Capes pela bolsa concedida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

Verapamil (VP) e Oxcarbazepina (OX) são fármacos de baixo índice terapêutico que necessitam de rigoroso controle de qualidade em formulações farmacêuticas, bem como de análises em fluidos biológicos para estudos farmacológicos de eliminação dessas drogas. Neste sentido, o desenvolvimento de métodos simples, rápidos e de baixo custo é de extrema importância para quantificação desses fármacos nessas amostras. Deste modo, o presente trabalho apresenta um método eletroanalítico em fluxo para determinar VP e OX tanto em formulações farmacêuticas, quanto em amostras de urina. A técnica eletroquímica utilizada para quantificação foi a Amperometria de Múltiplos Pulsos (MPA) acoplada a um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA), utilizando o diamante dopado com boro (BDD). Foram aplicados três pulsos de potencial pela MPA para determinação do VP em meio de ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, sendo $+1,6 \text{ V}$ para a oxidação e, posteriormente, $+0,2 \text{ V}$ para redução do produto gerado do VP e $+0,1 \text{ V}$ para a limpeza do eletrodo de BDD. Para a determinação de OX, também foram otimizados três pulsos de potencial em meio de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0), sendo $+1,7 \text{ V}$ para a oxidação da OX e geração do produto que foi reduzido em $-1,1 \text{ V}$ e $-1,3 \text{ V}$ para a limpeza do eletrodo de BDD. Em ambos os casos, apenas o sinal obtido nos pulsos de potencial de redução foram utilizados para quantificação dos fármacos. As faixas lineares de trabalho obtidas para quantificação do VP e da OX foram de $0,8$ a $40,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ($R= 0,9976$) e $2,0$ a $80,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ($R= 0,9989$), respectivamente. Os limites de detecção foram calculados em $0,16 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para VP e $0,42 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para OX. Uma boa repetibilidade foi obtida para 10 análises consecutivas desses fármacos, com desvio padrão relativo de $2,2\%$ para VP e $0,94 \%$ para OX. Os estudos de adição e recuperação do VP e OX em amostras farmacêuticas e urina apresentaram resultados próximos a 100% e o doseamento do VP foi validado pela metodologia oficial. Altas frequências analíticas foram alcançadas pelo sistema FIA com 45 e 65 determinações por hora de VP e OX, respectivamente, usando alças de amostragem inferiores a $200 \text{ } \mu\text{L}$ e vazões de $3,5 \text{ mLmin}^{-1}$. Análises desses fármacos em amostras de urina mostraram que é possível determiná-los mesmo na presença de altas concentrações de ácido ascórbico e ácido úrico. Portanto, o método proposto mostrou-se como alternativa simples e rápida para quantificação desses fármacos em formulações farmacêuticas e urina.

Palavras chave: Verapamil; Oxcarbazepina; Amperometria de múltiplos pulsos; Análise por injeção em fluxo; Diamante dopado com boro.

ABSTRACT

Verapamil (VP) and Oxcarbazepine (OX) are drugs of narrow therapeutic index that require strict quality control in pharmaceutical formulations and analysis in biological fluids for pharmacological studies of elimination of these drugs. In this sense, the development of simple, fast and low-cost methods is very important to quantify these drugs in pharmaceutical samples. Therefore, this work presents a electroanalytical method in flow for determining VP and OX in pharmaceutical formulations and human urine samples. The electrochemical technique used for quantification was performed by multiple pulses amperometry (MPA) coupled to a flow injection analysis system (FIA), using boron-doped diamond (BDD) as working electrode. Were applied three potential pulses by MPA for the determination of VP in sulfuric acid 0.1 mol L^{-1} : (1) $+1.6 \text{ V}$ for oxidation of VP, (2) $+0.2 \text{ V}$ for reduction of the generated product of VP in the first potential pulse, (3) $+0.1 \text{ V}$ for cleaning of the BDD electrode surface. The determination of OX also was performed by MPA in three potential pulses in 0.1 mol L^{-1} acetate buffer (pH 4.0): (1) $+1.7 \text{ V}$ for oxidation of OX and generation of the product that it was reduced at (2) -1.1 V , and (3) -1.3 V for cleaning of the BDD electrode surface. In both cases, only the signal obtained in the reduction potential pulses were used for quantification of drugs. The linear ranges of work obtained for quantitation of VP and OX were 0.8 to $40.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ($R = 0.9976$) and 2.0 to $80.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ($R = 0.9989$), respectively. The detection limits were calculated to be $0.16 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ for VP and $0.42 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ for OX. Good repeatabilities were obtained for 10 consecutive injections of these drugs, with relative standard deviation of 2.2% for VP and 0.94% for OX. The addition and recovery studies for VP and OX in pharmaceutical and urine samples were close to 100% and determination of VP was validated by the official methodology. High analytical frequencies were achieved by FIA system of 45 and 65 determinations per hour for VP and OX, respectively, using sampling handles less than $200 \text{ } \mu\text{L}$ and flow rate of 3.5 mLmin^{-1} . The analysis of these drugs in urine showed that it is possible to determine this sample even in the presence of high concentrations of ascorbic acid and uric acid. Therefore, the present method by MPA-FIA proved to be a quick and easy alternative to quantify VP and OX in pharmaceutical formulations and urine.

Keywords: Verapamil. Oxcarbazepine. Multiple Pulse amperometry. Flow Injection Analysis System. Boron-doped diamond.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Variação de potencial na forma de uma onda triangular, em voltametria cíclica (1A) e voltamograma obtido por voltametria cíclica (1B).....	3
Figura 2 - Imagem do funcionamento do software GPES para detecção MPA em sistema em fluxo.....	5
Figura 3 - Fórmula estrutural do cloridrato de verapamil.....	10
Figura 4 - Fórmula estrutural da Oxcarbazepina	13
Figura 5 - Célula do tipo “wall jet” usada no sistema FIA. Em detalhe a região ampliada da interface do eletrodo de BDD.....	21
Figura 6 - Esquema de montagem do sistema FIA.....	21
Figura 7 - Voltamogramas cíclicos do eletrólito H_2SO_4 $0,1\text{mol L}^{-1}$ (linha preta) com adição do VP $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ após o tratamento anódico (linha azul) e após tratamento catódico (linha vermelha). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}	26
Figura 8 - Voltamogramas cíclicos do eletrólito H_2SO_4 $0,1\text{mol L}^{-1}$ (linha vermelha) com adição do VP $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ com varredura até o potencial de $2,2\text{ V}$ (linha azul) e com varredura até o potencial de $0,5\text{ V}$ (linha preta). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}	26
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos do eletrólito suporte H_2SO_4 $0,1\text{ mol L}^{-1}$ sob eletrodo de BDD com adição das espécies: VP $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ (linha azul), AA $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ (linha preta) e AU $0,5\text{ mmol L}^{-1}$ (linha vermelha). Velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} . Em detalhe o pico de oxidação do AU.....	27
Figura 10 - Sinal da corrente de pico de redução do VP (em módulo) em $0,0\text{ V}$ em função da variação do potencial de oxidação (gerador). Todos os pulsos de potencial foram aplicados no tempo de 100 ms . Vazão $3,0\text{ mL}^{-1}$ Alça $100\mu\text{L}$	28
Figura 11 - Sinal da corrente de redução do VP (em módulo) em função da variação do pulso de potencial de redução, aplicando o pulso de potencial gerador fixo em $1,6\text{V}$. Todos os pulsos de potencial foram aplicados no tempo de 100 ms . Vazão $3,0\text{ mLmin}^{-1}$ Alça $100\mu\text{L}$	29
Figura 12 - Sinal da corrente de redução do VP (em módulo) em $0,2\text{V}/100\text{ms}$ em função do tempo da aplicação do potencial gerador em $+1,6\text{ V}$. Vazão $3,0\text{ mLmin}^{-1}$ Alça $100\mu\text{L}$	30
Figura 13 - Escada de potenciais aplicados no BDD em função do tempo. (Linhas contínuas são os potenciais mostrados no amperograma e as linhas pontilhadas, os ocultos).....	31

Figura 14 - Sinal da corrente de redução do VP 0,1 mmolL ⁻¹ (em módulo) em 0,2V/100ms em função do volume de injeção no sistema FIA. Potencial gerador em +1,6 V/300ms e vazão 3,0 mL min ⁻¹	32
Figura 15 - Sinal da corrente de redução do VP 0,1 mmolL ⁻¹ (em módulo) em 0,2V/100ms em função da vazão do sistema FIA. Potencial gerador em +1,6 V/300ms e alça de 150µL.....	33
Figura 16 - Amperogramas de 10 injeções consecutivas de solução de VP 0,1 mmol L ⁻¹ em meio de ácido sulfúrico 0,1 molL ⁻¹ . Alça de 150 µL e vazão de 3,5 mL min ⁻¹	34
Figura 17 - FIAgramas e respectivas curvas de calibração obtidas por FIA-MPA sobre eletrodo de DDB com a injeção de soluções padrão contendo 0,8 (a), 1,0 (b), 2,0 (c), 4,0 (d), 8,0 (e), 10,0 (f), 20,0 (g) e 40,0 (h) µmolL ⁻¹ de VP. Alça de 150 µL e vazão de 3,5 mLmin ⁻¹	35
Figura 18 - Amperogramas de soluções de: Ácido Úrico (AU), Ácido Ascórbico (AA), VP e mistura dos três à 0,1 mmolL ⁻¹ . Como eletrólito suporte o Ácido sulfúrico 0,1 molL ⁻¹ . Alça de 150 µL e vazão de 3,5 mL min ⁻¹	37
Figura 19 - Voltamogramas cíclicos do tampão acetato (pH 4,0) 0,1mol L ⁻¹ (linha preta) com adição do OX 1,0 mmol L ⁻¹ após o tratamento anódico (linha verde) e após tratamento catódico (linha vermelha). Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ . Em destaque, o processo de redução da OX.....	41
Figura 20 - Voltamogramas cíclicos do tampão acetato 0,1mol L ⁻¹ pH 4,0 (linha preta) com adição do OX 1,0 mmol L ⁻¹ com varredura até o potencial de 2,2 V (linha vermelha) e com varredura até o potencial de 0,4 V (linha azul). Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ . Em destaque, região que ocorre o processo de redução da OX.....	42
Figura 21 - Voltamogramas cíclicos do tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,0 sob eletrodo de BDD (linha verde) com adição das espécies: OX 1,0 mmol L ⁻¹ (linha azul), AA 1,0 mmol L ⁻¹ (linha preta) e AU 1,0 mmol L ⁻¹ (linha vermelha). Velocidade de varredura de 50 mVs ⁻¹ . Em detalhe os picos de oxidação do AA e do AU.....	43
Figura 22 - Sinal da corrente de pico de redução da OX (em módulo) em - 1,0 V em função da variação do potencial de oxidação (gerador). Todos os pulsos de potencial foram aplicados no tempo de 100 ms. Alça de 100 µL e vazão de 3,0 mL min ⁻¹	44
Figura 23 - Sinal da corrente de redução da OX (em módulo) em função da variação do pulso de potencial de redução, aplicando o pulso de potencial gerador fixo em 1,7 V. Todos os pulsos de potencial foram aplicados no tempo de 100 ms. Alça de 100 µL e vazão de 3,0 mL min ⁻¹	45

Figura 24 - Sinal da corrente de redução da OX (em módulo) em -1,1V/100ms em função do tempo da aplicação do potencial gerador em +1,7 V. Alça de 100 μL e vazão de 3,0 mL min^{-1}	45
Figura 25 - Escada de potenciais aplicados no BDD em função do tempo. (Linhas contínuas são os potenciais mostrados no amperograma e as linhas pontilhadas, os ocultos).....	47
Figura 26 - Sinal da corrente de redução da OX 0,1 mmol L^{-1} (em módulo) em -1,1V/30ms em função do volume de injeção no sistema FIA. Potencial gerador em +1,7 V/200ms e vazão 3,0 mL min^{-1}	47
Figura 27 - Sinal da corrente de redução da OX 0,1 mmol L^{-1} (em módulo) em -1,1V/30ms em função da vazão do sistema FIA. Potencial gerador em +1,7 V/200ms e alça de 200 μL	48
Figura 28 - Amperogramas de 10 injeções consecutivas de solução de OX 0,1 mmol L^{-1} em meio de tampão acetato 0,1 mol L^{-1} (pH 4,0). Alça 200 μL e vazão 3,5 mL min^{-1}	49
Figura 29 - FIAgramas e respectivas curvas de calibração obtidas por FIA-MPA sobre eletrodo de DDB com a injeção de soluções padrão contendo 2,0 (a), 4,0 (b), 8,0 (c), 10,0 (d), 20,0 (e), 40,0 (f) e 80,0 (g) $\mu\text{mol L}^{-1}$ de OX. Alça de 200 μL e vazão de 3,5 mL min^{-1}	50
Figura 30 - Amperogramas de soluções de: Ácido Úrico (AU), Ácido Ascórbico (AA), OX e mistura dos três à 0,1 mmol L^{-1} . Como eletrólito suporte o tampão acetato pH 4,0 0,1 mol L^{-1} . Vazão 3,5 mL min^{-1} e alça 200 μL	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela de propriedades físico-químicas do verapamil.....	11
Tabela 2 - Tabela de propriedades físico-químicas da oxcarbazepina.....	14
Tabela 3 - Composições das soluções de mistura do fármaco (VP ou OX) e AA ou AU.....	24
Tabela 4 - Valores otimizados para os parâmetros FIA.....	33
Tabela 5 - Resultados dos estudos de adição e recuperação na amostra farmacêutica de VP. Os estudos foram feitos em triplicata e o desvio padrão apresentado após sinal \pm	36
Tabela 6 - Doseamento de VP por FIA-MPA e UV. Os estudos foram feitos em triplicata e o desvio padrão é apresentado após sinal \pm	36
Tabela 7 - Estudo da interferência de AA no sinal do VP a $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ obtido no pulso de 0,2 V/100 ms.....	38
Tabela 8 - Estudo da interferência de AU no sinal do VP a $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ obtido no pulso de 0,2 V/100 ms.....	38
Tabela 9 - Estudos de adição e recuperação de VP em amostra de urina diluída 100 vezes. Estudos foram feitos em triplicata e o desvio padrão é apresentado após sinal \pm	39
Tabela 10 - Comparação dos parâmetros analíticos obtidos pelo método proposto e outros métodos eletroanalíticos descritos na literatura para a determinação de VP.....	40
Tabela 11 - Valores otimizados para os parâmetros FIA.....	49
Tabela 12 - Comparação dos parâmetros analíticos obtidos pelo método proposto e outros métodos eletroanalíticos descritos na literatura para a determinação de OX.....	51
Tabela 13 - Resultados dos estudos de adição e recuperação na amostra farmacêutica de OX. Os estudos foram feitos em triplicata e o desvio padrão apresentado após sinal \pm	52
Tabela 14 - Estudos de adição e recuperação de OX em amostra de urina diluída 100 vezes. Estudos foram feitos em triplicata e o desvio padrão é apresentado após sinal \pm	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Ascórbico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AU	Ácido Úrico
BDD	Diamante Dopado com Boro, do inglês, <i>Boron-doped diamond</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPR	Desvio Padrão Relativo
E	Potencial
Ec	Potencial coletor
Eg	Potencial gerador
ET	Eletrodo de Trabalho
FIA	Análise por Injeção em Fluxo, do inglês <i>flow injection analysis</i>
I _c	Corrente Capacitiva
I _F	Corrente faradaica
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MPA	Amperometria de Múltiplos Pulsos, do inglês <i>Multiple Pulse Amperometric</i>
OX	Oxcarbazepina
UV	Ultravioleta
VC	Voltametria Cíclica
VP	Verapamil

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	3
1.1 Considerações gerais	3
1.2 Técnicas eletroanalíticas	4
1.2.1 <i>Voltametria cíclica</i>	5
1.2.2 <i>Amperometria de múltiplos pulsos</i>	6
1.3 Sistema de injeção em fluxo acoplado à MPA	8
1.3.1 <i>Vazão do sistema FIA</i>	8
1.3.2 <i>Volume de amostragem</i>	9
1.4 Eletrodo de diamante dopado com boro	9
1.5 Métodos para determinação dos fármacos	11
1.5.1 <i>Verapamil</i>	12
1.5.2 <i>Oxcarbazepina</i>	15
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 PARTE EXPERIMENTAL	21
3.1 Reagentes, soluções e amostras	21
3.1.1 <i>Preparo das soluções de amostras dos medicamentos</i>	21
3.1.2 <i>Preparo das soluções de amostras de urina</i>	22
3.2 Instrumentação	22
3.2.1 <i>Eletroanalítica</i>	22
3.2.2 <i>Espectrofotométrica</i>	24
3.3 Medidas eletroquímicas	24
3.3.1 <i>Comportamento eletroquímico dos fármacos</i>	24
3.3.2 <i>Parâmetros FIA-MPA</i>	24
3.4 Repetibilidade e faixa linear de trabalho	25
3.5 Estudos dos limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e ensaios de adição e recuperação em amostras farmacêuticas	25
3.6 Avaliação da ação de interferentes como ácido ascórbico e ácido úrico	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Verapamil	27
4.1.1 <i>Comportamento eletroquímico do Verapamil</i>	27

<i>4.1.2 Determinação dos pulsos de potencial</i>	29
<i>4.1.3 Otimização do tempo de plicação dos potenciais de detecção</i>	31
<i>4.1.4 Otimização do potencial e tempo de limpeza</i>	32
<i>4.1.5 Determinação da vazão e alça de amostragem para detecção FIA-MPA</i>	33
<i>4.1.6 Ensaios de repetibilidade e faixa linear de trabalho</i>	36
<i>4.1.7 Validação da metodologia</i>	37
<i>4.1.8 Avaliação de interferência de ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU) para a determinação em urina</i>	39
<i>4.1.9 Comparação entre parâmetros analíticos dos métodos eletroquímicos da literatura e o FIA-MPA proposto</i>	41
4.2 Oxcarbazepina	42
<i>4.2.1 Comportamento eletroquímico da Oxcarbazepina</i>	42
<i>4.2.2 Determinação dos pulsos de potencial e tempos de aplicação</i>	45
<i>4.2.3 Determinação da alça de amostragem e vazão do sistema FIA</i>	49
<i>4.2.4 Repetibilidade e faixa linear de trabalho</i>	51
<i>4.2.5 Comparação entre parâmetros analíticos dos métodos eletroquímicos da literatura e o FIA-MPA proposto</i>	52
<i>4.2.6 Validação da metodologia</i>	53
<i>4.2.7 Avaliação da interferência de ácido ascórbico e ácido úrico na análise de Oxcarbazepina na urina</i>	54
5 CONCLUSÕES	57
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Os medicamentos vêm sendo cada vez mais alvo de estudo em diversas áreas de pesquisa, sobretudo em relação aos procedimentos relativos ao controle de qualidade. Tais procedimentos são de enorme importância para garantir a autenticidade e doseamento correto do produto final a ser comercializado. Assim, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos mais simples, rápidos e de custo acessível para aplicação tanto pela indústria farmacêutica, quanto pelo setor de manipulação de medicamentos, o qual geralmente carece de uma infraestrutura de grande porte para realizar este controle de qualidade.

O setor de manipulação de medicamentos está em constante crescimento no Brasil (CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA, 2015), provavelmente, devido à procura por medicamentos de custo mais acessível, bem como a adequação de doses personalizadas, em conformidade com as necessidades individuais. Contudo, o controle de qualidade dos medicamentos produzidos é indispensável, assim como nas indústrias farmacêuticas, principalmente, quando se trata da classe de medicamentos de baixo índice terapêutico, cuja dose terapêutica é bem próxima à dose tóxica (HARDMAN; LIMBIRD, 2005), como é o caso dos fármacos Verapamil (VP) e Oxcarbazepina (OX), os quais são estudados no presente trabalho. Cabe ressaltar que, no setor de manipulação de medicamentos a produção é em escala consideravelmente menor que nas indústrias, portanto, a utilização de métodos analíticos com custo reduzido e de simples aplicação torna-se ainda mais requerida por este setor.

Os métodos cromatográficos, em destaque, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção no ultravioleta (UV), são os mais recomendados como metodologia oficial e, em geral, utilizados no controle de qualidade de fármacos pelas indústrias, o que se deve, principalmente, à alta robustez, bem como a elevada seletividade das análises por CLAE-UV. No entanto, as metodologias cromatográficas apresentam alguns inconvenientes, como a alta geração de resíduos orgânicos, alto custo tanto de aquisição do equipamento e reagentes, bem como de manutenção, além da baixa frequência analítica e alta complexidade para operação do equipamento. Embora muitos medicamentos apresentem apenas um princípio ativo, muitas vezes é necessária uma análise por cromatografia devido à interferência dos excipientes na detecção por espectrofotometria.

Tendo em vista estes inconvenientes, novas técnicas analíticas vêm sendo investigadas para aplicação no doseamento de fármacos, e neste contexto, as técnicas eletroquímicas surgem como alternativa viável, apresentando análises mais rápidas, simples, de baixo custo e com baixa geração de resíduos orgânicos em comparação aos métodos cromatográficos. Porém, mesmo com todas as vantagens supracitadas, estas técnicas não estão sendo aplicadas de fato no controle de qualidade do setor farmacêutico. Isso se deve à baixa reprodutibilidade, bem como na complexidade de montagem dos eletrodos e células eletroquímicas.

Para contornar o problema da baixa reprodutibilidade, o presente trabalho utiliza a combinação da amperometria de múltiplos pulsos, do inglês *Multiple pulse amperometry*, (MPA), com sistema de análise em por injeção em fluxo (FIA, do inglês *Flow injection analysis*), usando um eletrodo de trabalho de filme de diamante dopado com boro do inglês, *Boron-Doped Diamond* (BDD). A associação da MPA com o sistema FIA traz ao método diversas vantagens, como por exemplo: (i) a diminuição da contaminação e/ou passivação do eletrodo pela possibilidade de aplicação de um pulso de potencial de limpeza pela MPA e também pelo fluxo contínuo do eletrólito provocado pelo FIA; (ii) uma alta frequência analítica obtido pelo sistema FIA; (iii) e maior seletividade pela detecção MPA, devido à possibilidade de aplicação de vários pulsos de potencial e a possibilidade de eliminação de interferentes (GIMENES et al., 2010);. Essas vantagens são ainda aliadas à utilização do eletrodo de BDD, que além de ser altamente estável, apresenta uma ampla faixa de potencial ($\sim -1,5$ a $2,2$ V) e uma baixa corrente capacitiva (KUZMANOVIC. 2015).

Neste contexto, este trabalho propõe utilizar a técnica de detecção MPA em sistema FIA com eletrodo de BDD para determinar dois fármacos de baixo índice terapêutico, VP e OX. Uma breve revisão dos conceitos e trabalhos da literatura sobre o sistema de detecção eletroanalítico e de análises em fluxo está apresentado nos itens subsequentes, bem como do eletrodo de BDD e das características farmacológicas e métodos analíticos para quantificação dos fármacos VP e OX.

1.2 Técnicas eletroanalíticas

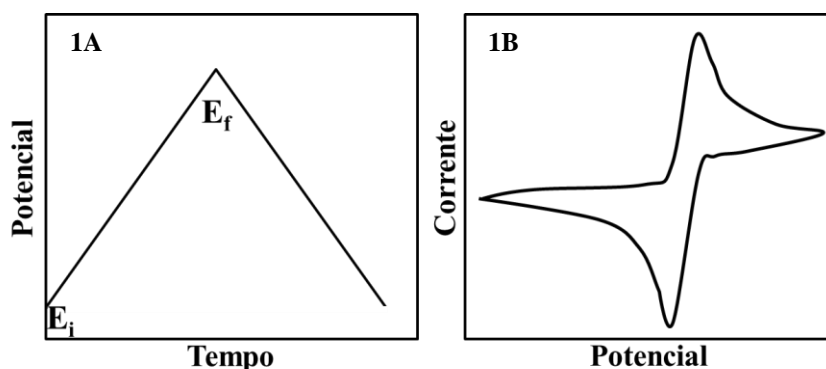
O desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas vem se expandindo nos últimos anos devido às suas vantagens apresentadas anteriormente frente aos demais métodos de análise, como alta sensibilidade, precisão, exatidão, baixos limites de detecção e quantificação e baixos custos de análises (CARREIRA, 2008; MIRANDA et al., 2012). As

técnicas eletroanalíticas, são baseadas na interação da eletricidade com as espécies químicas e os parâmetros destas espécies podem ser relacionados com as grandezas como corrente, potencial ou carga (WANG, 1999). Uma grande diversidade de técnicas eletroanalíticas estão disponíveis atualmente para realização de medidas qualitativas e/ou quantitativas, entre elas destacam-se as técnicas voltamétricas e amperométricas.

1.2.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica bastante utilizada para investigação do comportamento eletroquímico dos compostos de interesse, visto que é possível adquirir informações qualitativas sobre a termodinâmica e cinética para o estudo do processo eletroquímico de um composto eletroativo (BRETT; BRETT, 1996). O funcionamento da VC baseia-se na aplicação de uma variação linear de potencial, à velocidade constante em função do tempo. A varredura vai de um potencial inicial (E_i) até alcançar um potencial final (E_f), neste ponto, a direção é invertida e vai de encontro ao E_i . Esta varredura é feita na forma de uma onda triangular, e em presença de espécies eletroativas gera reações de oxidação e/ou redução, este esquema de aplicação de potencial é apresentado na Figura 1A (TICIANELLI; GONZALEZ, 2005). O gráfico gerado com esta perturbação é de corrente versus potencial e é denominado voltamograma cíclico (Figura 1B).

Figura 1 - Variação de potencial na forma de uma onda triangular, em voltametria cíclica (1A) e voltamograma obtido por voltametria cíclica (1B).



Na VC e nas demais técnicas eletroanalíticas, em geral, são utilizados três eletrodos: trabalho, referência e auxiliar (ou contra eletrodo). O eletrodo de trabalho corresponde aquele no qual ocorrem as reações eletroquímicas de interesse. O potencial aplicado ao eletrodo de trabalho para as medidas voltamétricas é controlado em relação a um

eletrodo de referência, cujo potencial se mantém constante. O eletrodo auxiliar completa o circuito da eletrólise. Além da VC, outras técnicas são utilizadas devido à busca por uma maior sensibilidade para quantificação dos analitos, como é o caso das voltametrias pulsadas ou da amperometria, a qual foi usada neste trabalho na forma de múltiplos pulsos.

1.2.2 Amperometria de múltiplos pulsos

A amperometria pode ser definida como um sistema voltamétrico que funciona em potencial constante (BRETT; BRETT, 1996). Portanto, numa análise amperométrica é medida a corrente de um processo eletroquímico característico do analito no potencial selecionado e aplicado. No entanto, um inconveniente relacionado à técnica é a impossibilidade de análise simultânea de duas substâncias eletroativas com potenciais diferentes, já que apenas um potencial pode ser aplicado. Além disso, não é possível a determinação indireta de um analito eletroativo (detecção do produto gerado) pela amperometria convencional, o que é bastante requerido para análises em amostras mais complexas, a fim de evitar interferentes. Além disso, na amperometria convencional não é possível aplicar um potencial para realizar a limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho provocando uma baixa estabilidade do sinal eletroquímico devido à contaminação e/ou passivação da superfície deste eletrodo.

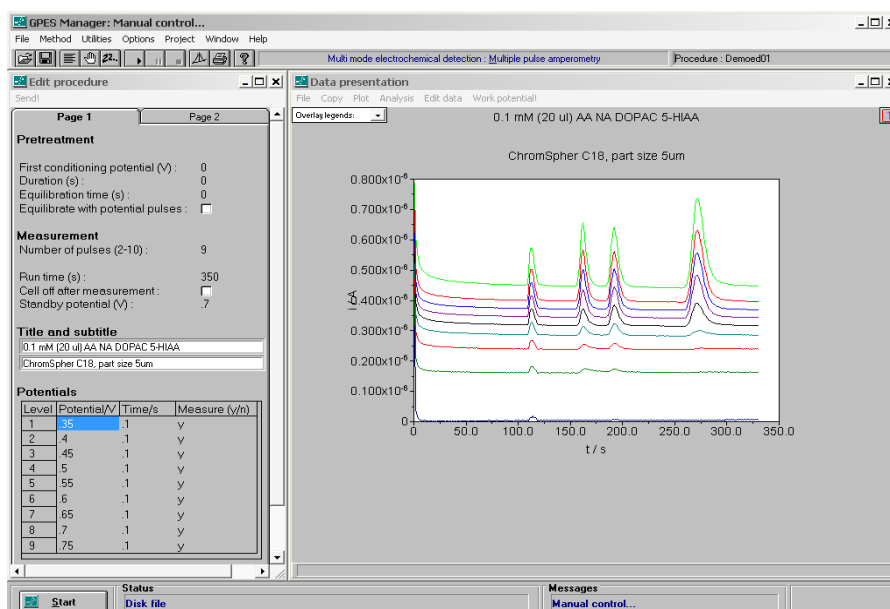
A amperometria no modo pulsado, MPA, pode contornar esses problemas através da aplicação sequencial de diferentes pulsos de potencial, suprimindo as limitações impostas pela amperometria convencional. É possível a aplicação e monitoramento de até dez pulsos de potencial distintos. Atualmente no mercado, existem vários equipamentos que utilizam esta técnica pulsada, porém na maioria deles é possível o monitoramento de apenas um pulso de potencial. Atualmente, o único software que permite a aquisição de sinal de até dez pulsos de potencial é o GPES, disponível nos potenciostatos da Metrohm - Eco Chemie. No entanto, devido ao grande número de trabalhos publicados e citações usando a detecção MPA, as novas versões de alguns softwares disponibilizados pela Metrohm e por outras empresas já estão possibilitando aquisição dos sinais de correntes obtidos pelos pulsos de potencial aplicados.

Uma das principais vantagens da detecção MPA é a possibilidade de ser utilizado no caso de analitos eletroativos que possuem processos eletroquímicos dependentes. Como é o caso do VP e OX, cujo produto da sua oxidação no eletrodo pode ser reduzido posteriormente em outro pulso de potencial. Assim a detecção MPA possibilita aplicar um

pulso de potencial, chamado de potencial gerador (E_g), por um determinado tempo, o que pode gerar um produto a ser reduzido em outro pulso de potencial, chamado de potencial coletor (E_c).

Na Figura 2 é mostrado como funciona a aquisição de dados pelo software GPES na detecção MPA. Do lado esquerdo da tela do programa, é localizada a barra de funções, na qual pode-se selecionar os parâmetros pertinentes à análise que deseja-se realizar. Dentre estes parâmetros, pode-se destacar, o número de pulsos a serem aplicados (de 2 a 10), o tempo total de duração da análise, os potenciais aplicados, o tempo de aplicação destes potenciais (que pode ser no mínimo 30 ms por limitação deste software), e por fim pode escolher se haverá (y) ou não (n) a aquisição da corrente gerada no pulso de potencial selecionado. Os dados obtidos através da aplicação dos parâmetros selecionados são apresentados no lado direito da Figura 2. O gráfico (amperograma) obtido é de corrente (i/A) versus tempo (t/s). O sinal do analito em um sistema em fluxo é dado por um pico de corrente para cada injeção da amostra.

Figura 2 - Imagem do funcionamento do software GPES para detecção MPA em sistema em fluxo.



O tempo de aplicação dos pulsos de potencial em MPA é um parâmetro muito importante, visto que o tempo influencia de forma significativa na corrente obtida e pode gerar maior sensibilidade nas análises. Os tempos de aplicação dos pulsos de potenciais variam de 30 a 500 ms, sendo a corrente coletada nos últimos 5 ms de cada pulso. Tempos

menores que 100 ms, apresentam maior sensibilidade, portanto são requeridos para detecção. Isso ocorre porque, apesar da corrente capacitiva (i_C) decair mais rapidamente que a corrente faradaica (i_F), no sistema FIA-MPA, a i_C já faz parte da corrente de fundo do amperograma e é constante no decorrer da análise, em detrimento, i_F é maior no menor tempo de aplicação do potencial. É importante salientar que essa diferença não seria observada se a vazão fosse suficiente para repor as espécies na superfície do eletrodo em qualquer tempo aplicado. No entanto, tempos maiores são mais utilizados quando se deseja fazer a limpeza e reativação da superfície do eletrodo de trabalho. Quando se trabalha com o sistema gerador – coletor, tempos maiores também são utilizados no E_g , a fim de gerar mais espécies a serem oxidadas ou reduzidas no E_c .

1.3 Sistema de injeção em fluxo acoplado à MPA

O sistema FIA foi empregado pela primeira vez por Růzicka e Hansen em 1975 (RUZICKA; HANSEN, 1975), ele surgiu como uma alternativa promissora e atrativa, oferecendo vantagens em relação aos sistemas estacionários, como elevada frequência analítica, consumo reduzido de amostra e o contato reduzido do analista com os reagentes. Seu uso vem sendo crescente, mediante acoplamento com diversas técnicas, como absorção atômica, fluorescência, voltametria, amperometria, entre outras (dos SANTOS et al., 2011).

O acoplamento do sistema FIA à MPA agrega as vantagens das análises em fluxo com aquelas da detecção amperométrica pulsada, o que possibilita o desenvolvimento de metodologias mais rápidas e reprodutíveis. Dois parâmetros importantes no sistema FIA devem ser otimizados, a vazão do sistema e a alça de amostragem (volume da amostra injetado), os quais serão abordados a seguir.

1.3.1 Vazão do sistema FIA

A vazão em sistemas FIA é a quantidade de eletrólito suporte que chega ao detector por unidade de tempo. É um importante parâmetro a ser estudado, visto que seu valor influencia diretamente na sensibilidade das análises. O aumento da vazão do sistema possibilita maior transporte de massa para a superfície do eletrodo, provocando a diminuição da camada de difusão de Nernst, o que propicia um ganho em termos sinal analítico pelo aumento da i_F . Entretanto, quando se trabalha com sistema gerador-coletor, há uma necessidade de avaliar até quando o aumento do fluxo favorece o aumento do sinal no

potencial coletor. Isso ocorre porque, o aumento da vazão leva mais substâncias à superfície do eletrodo, onde é gerado o produto da reação redox, porém, em contrapartida, as vazões muito elevadas geram um decréscimo da corrente do E_c devido à remoção, pelo fluxo, das espécies eletroquimicamente geradas na superfície do eletrodo antes destas serem detectadas.

1.3.2 Volume de amostragem

O volume de amostragem em sistemas FIA é definido pela alça de amostragem utilizada, que é o compartimento onde é medida a quantidade de analito a ser injetada no sistema. Alças usualmente empregadas são de 50 a 500 μL . A altura de pico é o parâmetro obtido no amperograma que é levado em consideração para a otimização tanto na vazão quanto na alça de amostragem. Para detecção direta (no E_g), durante o caminho da amostra do injetor até o detector há uma dispersão longitudinal do centro da amostra, ou seja, a amostra é diluída ao longo do percurso analítico no sistema FIA. O aumento do volume da alça de amostragem faz com que essa dispersão diminua no centro da amostra e a magnitude da corrente de pico torna-se maior até atingir um limite onde o centro da amostra não sofre mais dispersão com aumento do volume injetado. Para detecção indireta no E_c , este efeito vai depender da quantidade de composto gerado e, em alguns casos, o maior volume de amostra pode proporcionar análises de maior sensibilidade. Cabe levar em consideração também que, volumes de amostra muito grandes comprometem a frequência analítica do método e podem gerar maiores problemas de contaminação e/ou passivação do eletrodo de trabalho.

Para a obtenção de um de pico de sinal transiente em cada injeção do analito, deve-se assegurar a obtenção do número mínimo de pontos. Isto está relacionado com a vazão do sistema, o volume da alça utilizada e a velocidade de aquisição dos dados. Estudos realizados por dos SANTOS *et al.* (2009) e colaboradores demonstraram que o pico apresentado no amperograma deve ter no mínimo 20 pontos de aquisição de corrente, caso contrário pode haver distorções dos sinais e consequentemente uma baixa reprodutibilidade dos resultados.

1.4 Eletrodo de diamante dopado com boro

Os primeiros relatos de produção de filmes de diamante dopado com boro são de 1973, tal processo foi realizado em baixas pressões, a partir de $\text{B}_2\text{H}_6\text{CH}_4$ usando como

substrato pequenas porções de diamante natural (de BARROS et al., 2005). Os filmes de diamante se comportam como semicondutores, e sua condutividade está relacionada ao material e nível de dopagem. Existem diferentes tipos de dopante, dentre eles o nitrogênio, fósforo, enxofre e boro. O último é o mais utilizado e o nível de dopagem pode variar de 10 a 10000 ppm (ALFARO et al, 2006; PLESKOV, 2000).

Na eletroquímica, um eletrodo de BDD foi utilizado pela primeira vez por Pleskov e colaboradores (1987) e desde então vem despertando interesse nesta área, bem como diferentes métodos de fabricação, devido às várias vantagens que este eletrodo apresenta frente aos demais disponíveis. As principais propriedades do BDD que o destaca frente aos outros eletrodos de carbono com ligações sp^3 , tais como carbono vítreo, grafite e pasta de carbono, são: estabilidade à corrosão; baixa e estável corrente de fundo; estabilidade morfológica, mesmo exposto à alta temperatura; boa resposta à alguns analitos; fraca adsorção de moléculas polares e larga janela de potencial, independente do meio eletrolítico. Tendo em vista tais características, o BDD vem sendo bastante utilizado nos últimos anos, tanto para estudos eletroquímicos fundamentais, quanto para aplicações eletroanalíticas e ambientais (HUPERT et al., 2003; PANIZZA; CERISOLA, 2005).

Com o intuito de melhorar ainda mais as propriedades do BDD, é necessário que este passe por tratamentos em sua superfície. De acordo GIRARD e colaboradores (2007), é possível realizar a polarização anódica ou catódica da superfície do eletrodo através de um pré-condicionamento em solução ácida. O tratamento catódico torna a superfície do eletrodo terminada em hidrogênio e com tratamento anódico terminada em oxigênio. As superfícies terminadas em hidrogênio são hidrofóbicas, apresentando afinidade com moléculas mais apolares. Já as superfícies terminadas com oxigênio são hidrofílicas, apresentando afinidade com moléculas mais polares (GRANGER; SWAIN, 1999; YAGI, *et al.*, 1999; IVANDINI, *et al.*, 2006).

Várias metodologias que descrevem o tratamento da superfície do BDD são encontradas na literatura. Os primeiros trabalhos descreviam que para o tratamento era necessária a aplicação de +3,0 V por 30 minutos, e posteriormente, -3,0 V pelo mesmo tempo, terminando a superfície com hidrogênio (tratamento catódico) (SUFFREDINI *et al.*, 2004). Mas, realizando este procedimento, observou-se que o eletrodo degradava com o passar do tempo. Recentemente, estudos demonstraram que o tratamento ideal para a superfície do BDD é através da aplicação de $-9,0 \text{ C cm}^{-2}$, a fim de realizar tratamento catódico e $+5 \text{ C cm}^{-2}$ para terminar a superfície com tratamento anódico. Estes tratamentos devem ser realizados em solução aquosa de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, sendo que em ambos os casos não foi

observada nenhuma degradação do eletrodo mesmo com vários tratamentos (SALAZAR-BANDA, *et al.*, 2010).

1.5 Métodos para determinação dos fármacos

O controle de qualidade de medicamentos é imprescindível para que o produto final possa ser liberado para o uso pela população. Os ensaios para este controle de qualidade são baseados na farmacopeia brasileira e neste compendio são encontradas as normas, especificações e metodologias para o controle de qualidade de medicamentos. No caso de ausência de uma metodologia na farmacopeia nacional, as internacionais podem ser utilizadas (ANVISA, 2010). O doseamento dos princípios ativos na matéria prima e no produto acabado é um dos ensaios de controle de qualidade mais importantes, a fim de gerar uma maior segurança na administração dos medicamentos.

A necessidade de garantir a veracidade da quantidade de fármaco contido em uma formulação se torna ainda mais importante quando se trata de medicamentos de baixo índice terapêutico, como é o caso do VP e da OX. Os compostos cuja dose terapêutica é bastante próxima à dose tóxica são classificados como de baixo índice terapêutico e um pequeno erro na dosagem desses fármacos pode resultar em sérios danos a saúde ou até mesmo ao óbito de pacientes (HARDMAN; LIMBIRD, 2005). O índice terapêutico de um composto é calculado pela razão entre a dose letal da droga para 50% da população (DL_{50}) e dose efetiva mínima para 50% da população (DE_{50}) (GOODMAN & GILMAN, 2005).

Cabe destacar que, a classe de medicamentos de baixo índice terapêutico é única que o controle de qualidade de doseamento é exigido pela ANVISA para as farmácias de manipulação (ANVISA, 2007). No entanto, isso se torna inviável, principalmente, para as farmácias de manipulação com poucos recursos, pois geralmente o doseamento destes fármacos é feito por métodos cromatográficos ou espectrofotométricos com várias etapas de pré-tratamento na amostra. Dessa forma, o desenvolvimento e adequação de métodos de analíticos, para torná-los mais simples, rápidos, de baixo custo e com menor geração de resíduos, são fundamentais para serem usados em farmácias de manipulação, bem como nas indústrias farmacêuticas, oferecendo um método alternativo mais econômico e ambientalmente mais sustentável.

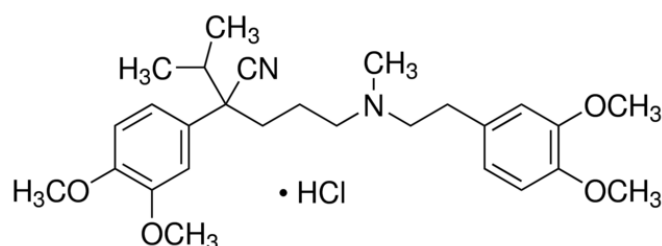
Outro ponto a ser considerado é a determinação dessas drogas em fluidos biológicos, visto que essa medida pode levar ao diagnóstico de uma possível intoxicação por

determinado fármaco e também estudos farmacológicos dos medicamentos. Por exemplo, na urina geralmente há excreção de uma determinada porcentagem do fármaco, e com base nesse conhecimento pode-se estimar se a quantidade ingerida foi devidamente consumida pelo organismo do indivíduo. No entanto, neste tipo de amostra temos muitos interferentes, sendo os principais que apresentam eletroatividade os ácidos ascórbico (AA) e úrico (AU). Estes estão presentes na urina em concentrações entre 570 a 3400 μmolL^{-1} e aproximadamente de 450 μmolL^{-1} , para AA e AU, respectivamente. No entanto, esses ácidos não apresentam sinais de redução no eletrodo de BDD, logo é possível quantificar fármacos em urina, de forma seletiva pela detecção indireta na MPA de compostos que podem oxidar e o seu produto de oxidação pode ser reduzido em pulsos de potenciais catódicos, como é caso da OX e do VP.

1.5.1 Verapamil

O cloridrato de verapamil (α -[3-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]metilamino]propil]-3,4-dimetoxi- α -(1-metiletil)-benzenoacetonitrila) é classificado como um agente antiarrítmico da classe IV das fenilalquilaminas e atua como bloqueador do canal de íons Ca^{2+} . A fórmula estrutural do VP é apresentada na Figura 3. O fármaco é utilizado no tratamento de diversas doenças cardiovasculares, como hipertensão, angina de peito, prevenção secundária de infarto agudo do miocárdio e taquicardia supraventricular (PAGE et al., 2004).

Figura 3 - Fórmula estrutural do cloridrato de verapamil.



O mecanismo de ação do VP baseia-se na redução da magnitude de corrente de íons Ca^{2+} através do canal lento e também diminui a taxa de recuperação do canal. Além disso, o bloqueio do canal provocado pelo fármaco é reforçado pela frequência de estimulação aumentada. O VP também deprime a taxa de marcapasso do nódulo sinusal e condução atrioventricular lenta (GOODMAN; GILMAN, 2005). As propriedades físico-químicas do VP são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Tabela de propriedades físico-químicas do verapamil.

Fórmula molecular	$C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$
Massa Molar	491,06 $g\text{mol}^{-1}$
Ponto de fusão	142 °C
Solubilidade	Solúvel em água
pKa	8,92
Descrição	Sólido cristalino

Fonte: Sigma-Aldrich

A concentração de VP que resulta em bons efeitos terapêuticos varia de 0,10 a 0,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no plasma, níveis acima deste valor podem gerar alguns efeitos colaterais como arritmia, bloqueio atrioventricular, náuseas, constipação e hipotensão. Uma concentração acima de 2,28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tem grande risco de levar o indivíduo ao óbito (MÉGARBANE et al., 2010).

Portanto, metodologias para a determinação de VP são de extrema importância, tendo em vista a necessidade de assegurar o doseamento correto do fármaco em formulações. Também é relevante a determinação do VP em fluidos biológicos, a fim de identificar possíveis intoxicações com o fármaco. No entanto, apenas cerca de 3% é excretado na urina na forma de VP, o restante é metabolizado no organismo, desta forma, os métodos analíticos para o doseamento de VP em fluidos, além de eficientes devem ser bastante sensíveis.

A metodologia oficial para o doseamento de VP descrita na farmacopeia brasileira é espectrofotometria de absorção no ultravioleta (ANVISA, 2010). Na literatura também são encontrados vários métodos para a determinação do fármaco em amostras farmacêuticas e em fluidos biológicos. Dentre esses, destacam-se os métodos baseados em CLAE com alguns tipos de detecção, como por exemplo, por UV (VALVO et al., 1997, IVANOVA et al., 2008, MILENOVIC et al., 2013); por fluorimétrica (HUBERT; CROMMEN, 1994) e por espectrometria de massas (VARON; MARÍÑO, 2015). Além dos métodos cromatográficos, são reportados trabalhos utilizando outras técnicas, como a espectrofotometria na região do UV (RAHMAN; HODA, 2002, RAHMAN; KHAN; AZMI, 2005); potenciometria (HASSAN et al., 1999) e eletroforese capilar (HAMIDIA; JOUYBAN, 2015). A maioria das metodologias apresentadas apresentam desvantagens para ser utilizada em laboratório com análises de rotina devido ao alto custo de análise e alta geração de resíduos, além da alta complexidade de execução e etapas de preparação prévia da amostra.

Sendo assim, os métodos eletroquímicos podem ser usados para determinar o VP de forma mais vantajosa que os métodos supracitados. Seis metodologias diferentes são encontradas na literatura para a determinação do fármaco por técnicas eletroanalíticas. No primeiro destes trabalhos publicado na literatura em 2002, foi utilizada a voltametria de redissolução adsortiva com um eletrodo de Hg de gota pendente. O VP reduziu neste eletrodo em um potencial de -1,81V em meio de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, e nestas condições, foi obtido um LD de apenas 0,5 n molL⁻¹ e um DRP, para cinco medidas consecutivas, de 1,8%. A metodologia foi aplicada em amostras farmacêuticas e de urina (KASIM et al., 2002). Outra metodologia encontrada na literatura foi a detecção de VP em formulações farmacêuticas e urina por amperometria em fluxo, os autores utilizaram um eletrodo de trabalho modificado por cloreto de polivinilo, com isso obtiveram bons sinais eletroquímicos do VP em 0,1 e 0,2 V, conseguindo LD de 11,0 e 6,0 µmolL⁻¹ para os dois potenciais, respectivamente. O DRP obtido foi de 0,2% para 3 medidas (ORTUÑO; SÁNCHEZ-PEDREÑO; GIL, 2005).

Posteriormente, Demircan, Kir e Ozkan (2007) publicaram um artigo para a determinação eletroquímica de VP sem a modificação do eletrodo. O fármaco em meio de acetato 0,2 mol L⁻¹ pH 3,7 apresentou sinal de oxidação em 0,95 V no eletrodo de carbono vítreo. As condições de análise foram otimizadas em voltametria de onda quadrada (VOQ) e voltametria de pulso diferencial (VPD), obtendo LD inferiores a 0,16 µmol L⁻¹ em ambas as técnicas. As análises de VP foram realizadas em amostras farmacêuticas e soro, sendo encontrados DPR de 0,66 e 1,15 % (n=8) em VOQ e VPD, respectivamente. Também utilizando a VPD e VOQ, SEMAAN; CAVALHEIRO; BRETT (2009) desenvolveram uma nova metodologia para a determinação de VP em formulações farmacêuticas utilizando eletrodo de grafite com um compósito de poliuretano. Neste eletrodo, o fármaco apresentou dois picos de oxidação, em 0,6 e 0,75 V. Os estudos levaram a um LD de 0,7 µmol L⁻¹.

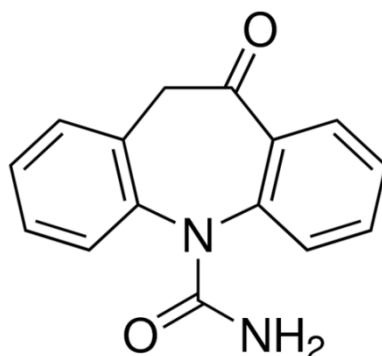
Em 2013 foram publicados dois trabalhos para a determinação de VP. Um foi realizado utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono multicamadas funcionalizados com um filme de policloridrato de alilamina. A detecção do fármaco em formulações foi feita por meio de VPD e VOQ, ambas com redissolução adsortiva. O LD encontrado para as duas técnicas foi de 3,6 nmolL⁻¹ e o DPR = 4,8% (OLIVEIRA et al., 2013). O outro trabalho de 2013 foi publicado por CHEN et al. (2013), onde os autores propuseram a utilização de um microchip incorporado em conjunto com nanoeletrodos de ouro para a determinação de VP em formulações e em soro. O eletrodo modificado conseguiu excelente eletrocatalise, sendo que o potencial de oxidação do VP foi próximo a 0,0 V. O LD alcançado foi de 1,0 ng mL⁻¹.

Todavia, os trabalhos publicados com as técnicas eletroanalíticas para determinação de VP não exploraram toda a potencialidade da área, pois alguns ainda apresentam metodologias que envolvem a modificação de eletrodos ou não exploram as vantagens das técnicas em fluxo para aumentar a frequência analítica. Sendo assim, é de grande relevância o desenvolvimento de uma nova metodologia que alie simplicidade de aplicação, baixo custo das análises, reprodutibilidade e alta frequência analítica. Estes parâmetros podem ser alcançados através da utilização do sistema proposto neste trabalho por FIA-MPA, utilizando um eletrodo altamente estável e sem modificação, o BDD, o qual até o presente momento não foi utilizado para determinação de VP.

1.5.2 Oxcarbazepina

A Oxcarbazepina (10,11-dihidro-10-oxo-5H-dibenzo[b,f]azepina-5-carboxamida) pertence ao grupo de medicamentos denominados anticonvulsivantes ou antiepilépticos é utilizada no tratamento de convulsões parciais e generalizadas além de generalizadas tônico-clônicas (HARDMAN; LIMBIRD, 2005). A fórmula estrutural da OX é apresentada na Figura 4. A OX é um ceto-análogo da carbamazepina. O fármaco é quase imediatamente todo convertido em seu principal metabólito ativo, e logo desativado e eliminado pelos rins (GOODMAN & GILMAN, 2005).

Figura 4 - Fórmula estrutural da Oxcarbazepina



O mecanismo de ação da OX baseia-se na indução de enzimas hepáticas e está associada à níveis aumentados de fenitopina e ácido válpróico. O fármaco é utilizado em monoterapia ou terapia adjuvante de crises epiléticas parciais em adultos e em crianças com idade entre 4-16 anos, bem como na terapia adjuvante em crianças com mais de dois anos

(GOODMAN & GILMAN, 2005). As propriedades físico-químicas do fármaco são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 - Tabela de propriedades físico-químicas da oxcarbazepina

Fórmula molecular	$C_{15}H_{12}N_2O_2$
Massa Molar	252,268 g mol ⁻¹
Ponto de fusão	215 °C
Solubilidade	Solúvel em acetonitrila e insolúvel em água
pKa	12,92
Descrição	Sólido branco

Fonte: Sigma-Aldrich

Apesar de apresentar maior tolerabilidade que a carbamazepina, a OX apresenta efeitos colaterais como erupção cutânea, fadiga, tontura, dor de cabeça, sonolência, náusea e vômito e diplopia (SCHACHTER, 1999). O fármaco é rapidamente absorvido no organismo, sendo que apenas cerca de 1% é excretado de forma inalterada pela urina (GOODMAN & GILMAN, 2005). Os estudos farmacológicos da OX apresentam importância clínica significativa, visto que podem auxiliar em diagnósticos de uma possível intoxicação pelo fármaco pela quantidade excretada. Desta forma é de grande relevância o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes e que aliem baixo custo, simplicidade de aplicação e rapidez das análises para a determinação da OX em amostras farmacêuticas e de urina.

Nas farmacopeias brasileira, americana e europeia não é encontrado um método oficial para o doseamento de OX. Portanto, o método sugerido para tal fim, é a CLAE com detecção UV, visto que é este o método utilizado na farmacopeia brasileira para o doseamento da carbamazepina, fármaco semelhante à OX. Na literatura, os métodos cromatográficos são os mais utilizados para a determinação deste fármaco, tais como a CLAE-UV (MENGE; DUBOIS, 1983, NOIRFALISE; COLLINGE, 1983, KUMPS, 1984, MENGE; DUBOIS; BAUER, 1987, PIENIMÄKI et al., 1995, SOUPPART et al., 2001, LEVERT; ODOU; ROBERT, 2002, MANDRIOLIA et al., 2003, QI et al., 2003, CONTIN et al., 2005, ALVES, 2007, KIMISKIDIS et al., 2007, MAZZUCHELLI et al., 2007, BHAUMIK et al., 2010, FORTUNA et al., 2012,) e CLAE acoplada a um espectrômetro de massas (KŁYS; ROJEK; BOLECHAŁA, 2005, BRETON et al., 2005). Outros métodos também são encontrados na literatura, como a espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta/visível

(GANDHIMATHI; RAVI, 2008, ENÉAS; OLIVEIRA; PIANETTI, 2010, BASAVAIAH et al., 2011, RAJENDRAPRASAD; BASAVAIAH; VINAY, 2012) e eletroforese capilar (BOCATO et al., 2014).

No entanto, estes métodos apresentam alguns inconvenientes na determinação de OX, os quais são os mesmos já mencionados para o VP. Sendo assim, do mesmo modo que para VP, os métodos eletroanalíticos podem ser uma alternativa para contornar tais inconvenientes. Quatro trabalhos foram encontrados na literatura para determinação do fármaco por técnicas eletroanalíticas, sendo que em três destes a análise foi apenas realizada em amostras farmacêuticas e um em amostras de urina.

Calvo e colaboradores utilizaram um eletrodo de mercúrio de gota pendente com a técnica voltametria adsortiva de onda quadrada. O meio eletrolítico otimizado foi tampão Britton-Robinson 0,1 molL⁻¹ pH 4,0, e neste meio, a OX apresentou um pico de redução em -1,04 V. Com essas condições, os autores obtiveram um LD de 0,17 µmolL⁻¹ e um DPR de 1,18% para oito amostras (CALVO; RENEDO; MARTÍNEZ, 2007). Os três outros trabalhos publicados utilizaram o eletrodo de carbono vítreo com detecção por voltametria de pulso diferencial. Apaydin e colaboradores utilizaram a modificação do eletrodo com filme eletropolimerizado de ácido p-aminobenzeno, o que gerou grande ganho na corrente de redução da OX no potencial de -1,27 V, em comparação com o eletrodo não modificado. Com isso, foi encontrado um LD de 0,127 µmolL⁻¹ e um DPR de 3,54% (APAYDIN et al., 2015). Já no trabalho de Abolhasani e colaboradores, o eletrodo foi utilizado sem modificação e a determinação foi realizada em meio de metanol contendo Bu₄NClO₄ 0,1 molL⁻¹, sendo que o fármaco apresentou um pico de oxidação em 1,84 V. Nessas condições, LD de 0,81 µmolL⁻¹ foi encontrado, e DRR de 3,23% para 5 análises (ABOLHASANI; HOSSEINIB; KHANMIRIB, 2014). Por fim, Nosal-Wiercińska e co-autores desenvolveram um trabalho para a determinação de OX em amostras farmacêuticas e de urina, usando eletrodo de carbono vítreo. Em meio de tampão Britton-Robinson pH 0,2 molL⁻¹ 8,05, o fármaco apresentou um pico de redução irreversível em -1,4 V. Os autores obtiveram LD de 1,65 µmolL⁻¹ e para 5 amostras, um DPR igual à 2,43% (NOSAL-WIERCIŃSKA et al., 2014).

Apesar dos trabalhos utilizando as técnicas eletroanalíticas terem mostrado as potencialidades deste tipo de detecção, nenhum deles utilizou o eletrodo de BDD e o sistema de fluxo para determinação da OX. Dessa forma, alguns parâmetros podem ser melhorados, como a frequência analítica e a reprodutibilidade das análises. Essa melhora pode ser alcançada tanto para OX quanto para VP com a utilização do método proposto neste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologias eletroanalíticas simples, com alta frequência analítica, com baixa geração de resíduos e com um baixo custo para a determinação de VP e OX em formulações farmacêuticas e em urina, baseados na detecção MPA acoplada a um sistema FIA utilizando eletrodo de BDD.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Estudar o comportamento eletroquímico do VP e da OX por meio da voltametria cíclica em diferentes pHs.
- ✓ Otimizar parâmetros da técnica MPA, como potenciais aplicados para detecção e limpeza e os seus respectivos tempos.
- ✓ Investigar melhor vazão e alça de amostragem do sistema FIA para a análise dos fármacos.
- ✓ Estudar condições para eliminação dos principais interferentes (ácido ascórbico e ácido úrico) em análise de urina.
- ✓ Realizar estudos de adição e recuperação nas amostras farmacêuticas, assim como o doseamento e comparação dos resultados com os obtidos pela metodologia oficial de cada fármaco.
- ✓ Realizar testes de adição e recuperação em amostras de urina.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes, soluções e amostras

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada com resistência superior a 18,2 MΩ cm obtida de um sistema de purificação Mili-Q. plus (Millipore) e os reagentes utilizados foram de grau analítico. Vários eletrólitos suporte foram estudados, como: ácido sulfúrico (Vetec) 0,1 mol L⁻¹, Hidróxido de sódio (Alphatec) 0,1 mol L⁻¹ e tampão Britton-Robinson 0,04 mol L⁻¹ em uma faixa de pH de 2,0 à 10,0, que foi preparado através da mistura de 0,4 mol L⁻¹ de ácido acético (Merck), ácido fosfórico (Vetec) e ácido bórico (Merck) e os seus diferentes valores de pH foram ajustados com hidróxido de sódio. O tratamento da superfície do BDD foi realizado em uma solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹.

Soluções de ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU), ambos os padrões da Sigma-Aldrich (São Paulo), foram preparados diretamente no eletrólito utilizado em cada análise à concentração de 1,0 mmol L⁻¹ e 0,1 mmol L⁻¹ para AA e AU, respectivamente. Soluções estoque de VP (Sigma-Aldrich) foram preparadas em água a uma concentração de 10,0 mmol L⁻¹ e posteriormente diluída no eletrólito suporte a ser estudado. O padrão de OX adquirido da Sigma-Aldrich apresenta-se na forma de uma solução em acetonitrila a uma concentração de 1,0 mg mL⁻¹, assim, alíquotas deste estoque foram diluídas no eletrólito em estudo para realização dos estudos eletroquímicos.

3.1.1 Preparo das soluções de amostras dos medicamentos

Para o preparo das amostras de medicamentos, vinte comprimidos de cada fármaco (adquiridos em drogarias na cidade de Diamantina-MG) foram pesados e macerados, posteriormente, a quantidade do pó necessário para obter a concentração do estoque do fármaco desejada foi transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL e completado com água (no caso do VP) ou com acetonitrila (no caso da OX). As diluições de cada fármaco foram feitas no eletrólito escolhido, para as análises eletroquímicas.

3.1.2 Preparo das soluções de amostras de urina

Para a preparação das amostras de urina, coletou-se 50 mL de urina de um paciente saudável, em seguida uma alíquota de 100 μL de amostra foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, sendo o volume completado com eletrólito, obtendo o fluido biológico diluído em 100 vezes. Essas amostras foram dopadas com padrão de VP ou OX para a análise de adição e recuperação.

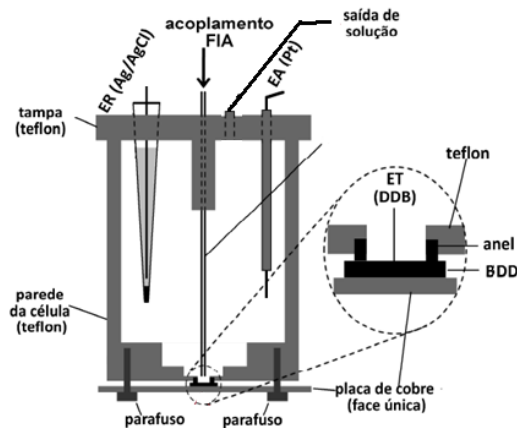
3.2 Instrumentação

3.2.1 Eletroanalítica

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato $\mu\text{Autolab}$ type III acoplado a um microcomputador com o software GPES 4.9. Os estudos do comportamento eletroquímico em sistema estacionário foram realizados em célula de três eletrodos, sendo Ag/AgCl (KCl saturado) o eletrodo de referência, um fio de platina o eletrodo auxiliar e como eletrodo de trabalho o BDD (Centro Suíço de Eletrônica e Microtecnologia), de 8000 ppm e área de $0,13\text{ cm}^2$ delimitada por um anel de borracha tipo *O-ring*.

Nas medidas eletroquímicas hidrodinâmicas utilizou-se uma célula eletroquímica do tipo “*wal jett*” como mostra a figura 5, em que também foram utilizados os mesmos três eletrodos já citados. Para acoplamento em sistema FIA, a célula consiste em um tubo de teflon, com capacidade de aproximadamente 30,0 mL. O eletrodo de trabalho, nesta célula é localizado na sua parte inferior, e os eletrodos de referência e auxiliar na parte superior. De forma centralizada e frontal ao eletrodo de trabalho, é colocada a tubulação por onde flui o eletrólito utilizado. Por fim, um orifício também na parte superior da célula permite a inserção da tubulação para o descarte do excesso do eletrólito na célula.

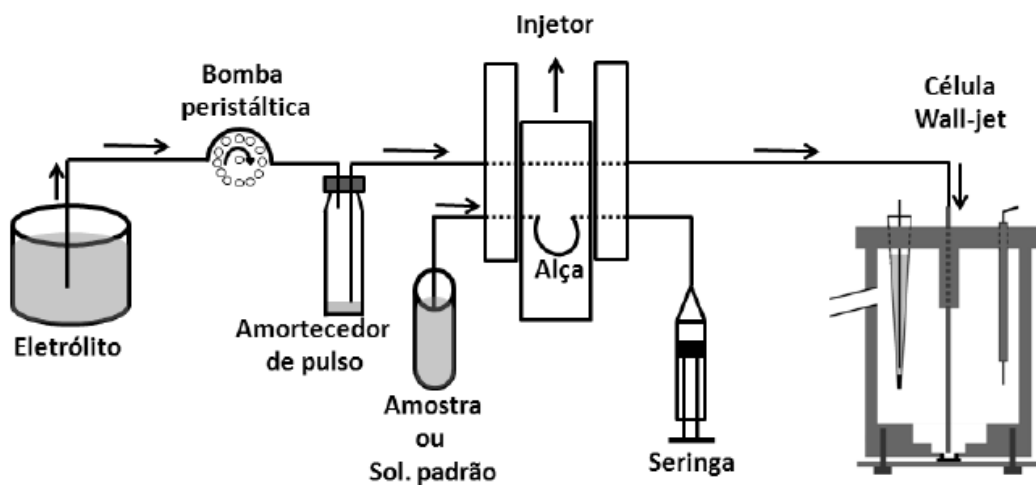
Figura 5 - Célula do tipo “wall jet” usada no sistema FIA. Em detalhe a região ampliada da interface do eletrodo de BDD.



Fonte: de MIRANDA, 2011.

O sistema FIA (Figura 6) de linha única é constituído por uma bomba peristáltica (Gilson) que impulsiona o eletrólito a passar por tubos de silicone em direção ao amortecedor de pulsos e posteriormente ao injetor. Este último possui dois canais (o que vai direto à célula e outro que passa pela alça de amostragem) a serem escolhidos pelo operador através de uma alavanca. O sistema de preenchimento da alça de amostragem é feito por meio de uma seringa que aspira a amostra de um béquer e preenche a alça.

Figura 6 - Esquema de montagem do sistema FIA



Fonte: de MIRANDA, 2011

3.2.2 Espectrofotométrica

Para as análises dos fármacos pelas metodologias oficiais descritas na farmacopeia, foi utilizado um espectrofotômetro UV-VIS da Varian, modelo Cary 50. Todos os experimentos foram realizados à temperatura e pressão ambiente.

3.3 Medidas eletroquímicas

3.3.1 Comportamento eletroquímico dos fármacos

O comportamento eletroquímico do VP e da OX foi estudado inicialmente por voltametria cíclica à velocidade de 50 mVs^{-1} numa janela de potencial de -1,5 a 2,2 V, em diversos meios: ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, tampão Britton-Robinson $0,04 \text{ molL}^{-1}$ numa faixa de pH de 2,0 à 10,0 e hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O BDD foi submetido a tratamentos anódico (i) e catódico (ii), a fim de avaliar uma possível melhora no sinal analítico, (i) o eletrodo foi tratado com a aplicação de -30 mA por 60 s e em sequência 1 mA por 120 s, sendo assim, a superfície ficou finalizada em tratamento anódico. (ii) aplicação de 1 mA por 60 s seguidos da aplicação de -30 mA por 360 s, assim, a superfície foi terminada de forma catódica, conforme descrito por SALAZAR-BANDA e colaboradores (2010).

3.3.2 Parâmetros FIA-MPA

A técnica de detecção utilizada para a determinação dos fármacos foi a MPA, que foi avaliada em função dos pulsos de potencial a serem empregados para a determinação dos fármacos, sendo avaliados o melhor potencial de oxidação, redução e limpeza da superfície do eletrodo de BDD, assim como os tempos de aplicação desses potenciais.

Os potenciais de detecção a serem aplicados para a otimização são escolhidos na faixa em que o fármaco apresenta sinal e o potencial de limpeza, em faixas onde não há processo. Para a realização destes estudos foram escolhidos a alça de amostragem de $100 \mu\text{L}$, numa vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ e tempo de aplicação dos pulsos de 100 ms. Depois de otimizados os pulsos de potenciais, os tempos dos pulsos foram estudados numa faixa de 30 a 500 ms.

Para o sistema FIA foram estudados o volume injetado e a vazão do sistema. Os volumes de amostra testados foram de 50, 100, 150, 200, 250 e 330 μL e as vazões de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 mL min^{-1} .

3.4 Repetibilidade e faixa linear de trabalho

Após a otimização dos parâmetros analíticos para a determinação FIA-MPA, foram realizados estudos para verificar a repetibilidade da metodologia desenvolvida, sendo avaliados os desvios padrão relativos das respostas de 10 injeções consecutivas de cada fármaco com concentração 0,1 mmolL^{-1} .

Foram feitos posteriormente estudos para a obtenção da faixa linear de trabalho, que foi estabelecida através da curva de regressão linear, feita através das médias das correntes de pico dos FIAGramas das injeções em triplicatas de solução padrão de cada fármaco da menor concentração detectada até a concentração de 0,1 mmolL^{-1} .

3.5 Estudos dos limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e ensaios de adição e recuperação em amostras farmacêuticas

O cálculo do limite de detecção foi feito multiplicando por três o desvio padrão da corrente do ruído da linha de base do FIAGrama da curva de calibração (coletados em 10 pontos aleatórios) e dividindo o valor pelo coeficiente angular da regressão. O mesmo cálculo foi feito para calcular o limite de quantificação, diferenciando-se apenas no fato de que o desvio padrão dos ruídos foi multiplicado por 10.

Posteriormente, foram realizados ensaios de adição e recuperação a fim de avaliar uma possível interferência da matriz da amostra. Nesse estudo, os padrões dos respectivos fármacos foram adicionados nas amostras farmacêuticas e de urina (diluída em dez ou cem vezes) e, posteriormente, foram avaliadas pela detecção MPA em FIA. Então, a porcentagem de recuperação do sinal amperométrico desses padrões pelo método proposto foi verificada para cada analito.

Foi realizado estudo para comparação da metodologia proposta para determinação do VP com a metodologia oficial descrita na farmacopeia brasileira: espectrofotometria de absorção no ultravioleta. A preparação da amostra para análise por espectrofotometria foi realizada por meio da pesagem e maceração de 20 comprimidos, a massa do pó obtido

equivalente a 100 mg do fármaco foi diluída em ácido clorídrico, obtendo concentração de 10 mmolL^{-1} e depois esta solução foi filtrada. Após esses passos, foi feita uma diluição e posterior medida a 278 nm. O mesmo procedimento foi feito com o padrão de VP e os resultados comparados (ANVISA, 2010).

Para a OX, não foi encontrada metodologia oficial para o seu doseamento, portanto, essa etapa de validação não foi realizada.

3.6 Avaliação da ação de interferentes como ácido ascórbico e ácido úrico

Dois estudos foram realizados para identificar se há interferência do AA e AU nas análises de VP e de OX. O primeiro foi realizado injetando em triplicata, soluções do padrão do fármaco, de AA, de AU e da mistura dos três, todos na mesma concentração. O outro estudo realizado foi fixando a concentração do padrão dos fármacos em $1,0 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$ e aumentou-se a concentração de AA e AU, separadamente, nas composições especificadas na Tabela 3:

Tabela 3 - Composições das soluções de mistura do fármaco (VP ou OX) e AA ou AU

Concentração molar fármaco: AA (μmolL^{-1})	Concentração molar fármaco: AU (μmolL^{-1})
1,0 : 0,0	1,0: 0,0
1,0 : 5,0	1,0:1,0
1,0 : 10,0	1,0:5,0
1,0 : 50,0	1,0:10,0
1,0 : 100,0	1,0:50,0
1,0 : 500,0	1,0:100,0

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

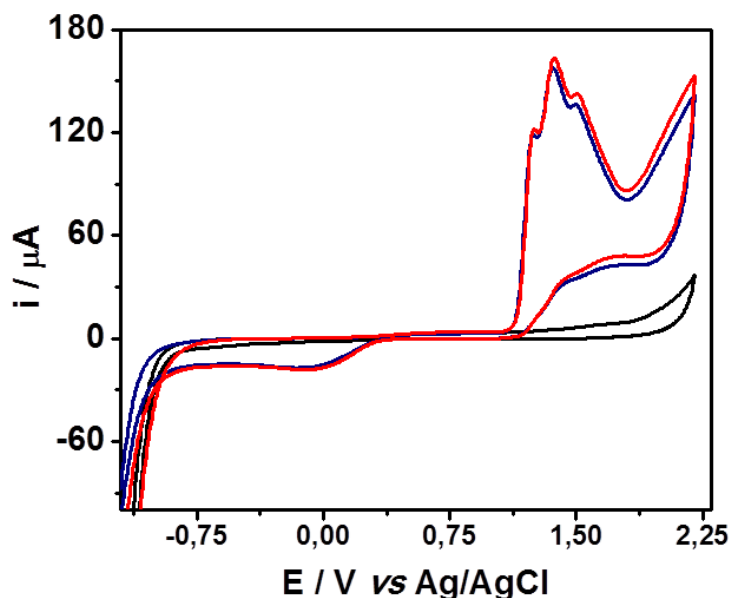
Os resultados e discussões deste trabalho serão divididos em duas partes. Na primeira, serão apresentados e discutidos os resultados associados ao desenvolvimento do método proposto para determinação do VP e na segunda parte serão abordados os resultados provenientes do desenvolvimento analítico para determinação de OX.

4.1 Verapamil

4.1.1 Comportamento eletroquímico do Verapamil

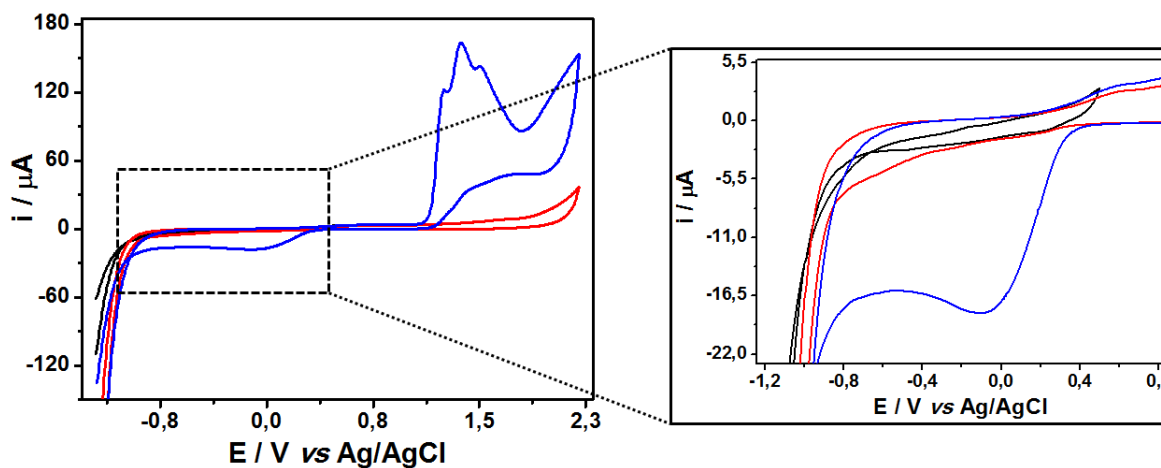
A voltametria cíclica foi utilizada para investigar o comportamento eletroquímico do VP em todos os eletrólitos citados na parte experimental. A faixa de potencial foi investigada em toda janela proporcionada pelo eletrodo de trabalho de BDD, sendo o oxigênio removido da solução por borbulhamento de nitrogênio antes das análises. Entre todos os eletrólitos avaliados, o eletrólito escolhido foi o H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} . A escolha do eletrólito foi realizada em função de uma melhor resolução dos sinais analíticos do fármaco, bem como uma maior sensibilidade e seletividade, sendo o que VP em H_2SO_4 apresentou três picos de oxidação em 1,24; 1,35 e 1,51 V e um pico de redução em 0,00 V, versus o eletrodo de Ag/AgCl, conforme mostrado na Figura 7. Após a escolha do eletrólito, foi avaliado o melhor tratamento para a superfície do BDD, que também é apresentado na Figura 7, onde são mostrados os voltamogramas cíclicos realizados com os tratamentos catódico e anódico. Observou-se com estes estudos que o tratamento não altera significativamente a superfície do BDD, foi notado apenas um discreto aumento na corrente dos picos de oxidação e redução após o tratamento catódico, sendo assim, este foi o escolhido para as análises posteriores.

Figura 7 - Voltamogramas cíclicos do eletrólito H_2SO_4 $0,1\text{mol L}^{-1}$ (linha preta) com adição do VP $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ após o tratamento anódico (linha azul) e após tratamento catódico (linha vermelha). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .



Estudos complementares em voltametria cíclica foram realizados para avaliar a dependência dos processos eletroquímicos, como mostrado na Figura 8. Um voltamograma de VP $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ foi feito com a varredura realizada apenas de $-1,2$ a $0,50\text{ V}$, e dessa forma, não foi observado nenhum processo de redução, como o observado quando a varredura alcançava os potenciais de oxidação do VP. Este estudo sugere que a redução do VP depende dos processos de oxidação, porém não é possível avaliar de qual pico advém o produto a ser reduzido, devido à proximidade deles.

Figura 8 - Voltamogramas cíclicos do eletrólito H_2SO_4 $0,1\text{mol L}^{-1}$ (linha vermelha) com adição do VP $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ com varredura até o potencial de $2,2\text{ V}$ (linha azul) e com varredura até o potencial de $0,5\text{ V}$ (linha preta). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

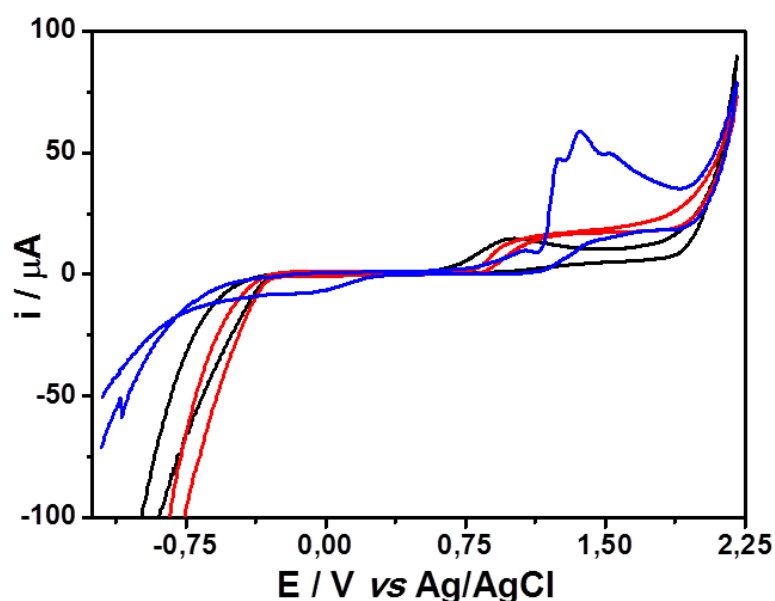


Estudos para elucidação do mecanismo de oxidação e redução do VP não foram realizados, no entanto, na literatura o processo de oxidação é atribuído aos grupos metoxi do anel fenil presentes na molécula. Os autores também propõem que esteja envolvido um elétron e um próton neste processo (DEMIRCAN; KIR; OZKAN, 2007). No entanto, é nítido que a oxidação do VP no eletrodo de BDD ocorre em três etapas devido a presença dos três picos observados. Na literatura, o processo de redução é relatado apenas quando usando eletrodo de Hg, e neste trabalho, os autores não discutem o processo (KASIM et al., 2002). Esse processo não foi verificado em outros eletrodos.

4.1.2 Determinação dos pulsos de potencial

Após os estudos do comportamento eletroquímico do VP, foi realizada a otimização dos parâmetros da detecção MPA visando uma maior sensibilidade, frequência analítica e seletividade. Como o AA e AU, principais interferentes em amostras de urina, apresentam picos de oxidação em potenciais inferiores aos do VP, como mostrado na Figura 9, optou-se para detecção e quantificação do fármaco em um pulso de potencial de redução, logo todas as otimizações são focadas neste potencial.

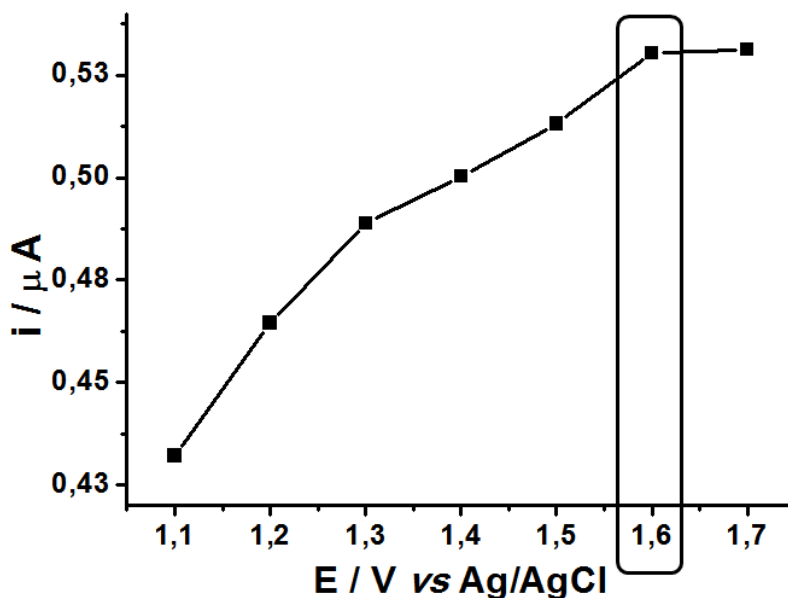
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos do eletrólito suporte H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sob eletrodo de BDD com adição das espécies: VP $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (linha azul), AA $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (linha preta) e AU $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (linha vermelha). Velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} .



Como mencionado anteriormente, o processo catódico é dependente do anódico, logo, há sempre a necessidade de aplicação de um potencial na região do pico oxidação do VP para gerar espécies, sendo este potencial denominado de potencial gerador (E_g). Foram avaliados os seguintes pulso de potencial geradores: 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6 e 1,7 V. O pulso de potencial para redução das espécies geradas, foi denominado de potencial coletor (E_c), o qual foi inicialmente fixado em 0,0 V, a fim de avaliar a sua corrente em função da aplicação de cada E_g aplicado. Todos os pulsos de potencial foram aplicados no tempo de 100 ms, na vazão de $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ e alça de $100 \mu\text{L}$.

Na Figura 10, é possível observar que a corrente de pico do E_c aumentou significativamente até quando se aplicava um E_g de 1,6 V, mas a partir deste valor não houve um crescimento significativo do sinal. Sendo assim, este valor de potencial para E_g foi utilizado nas análises posteriores.

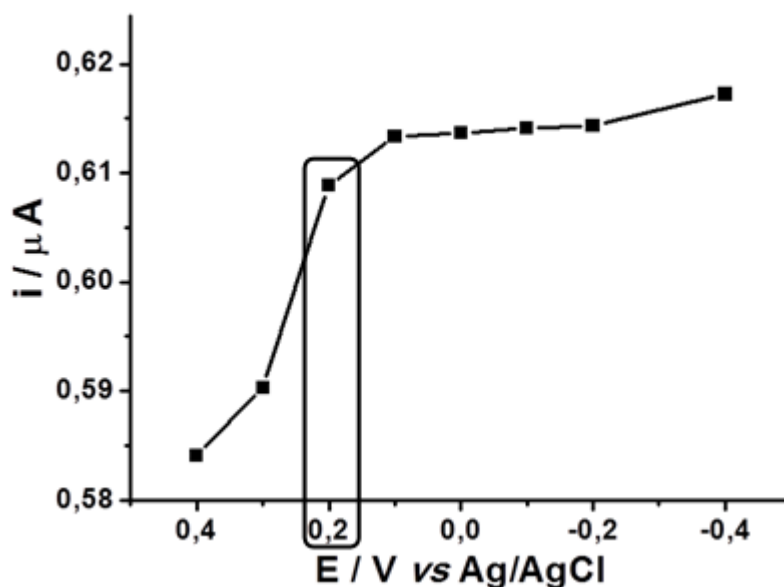
Figura 10 - Sinal da corrente de pico de redução do VP $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (em módulo) em 0,0 V em função da variação do potencial de oxidação (gerador). Todos os pulsos de potencial foram aplicados no tempo de 100 ms. Vazão $3,0 \text{ mL}^{-1}$ Alça $100 \mu\text{L}$.



Com o potencial de oxidação fixado em 1,6 V, foi realizado o estudo para verificar qual o melhor E_c . Foram testados os seguintes potenciais coletores: 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,0; -0,1; -0,2 e -0,4 V. Como apresentado na Figura 11, em potenciais mais catódicos a 0,4 V, o VP começa a apresentar uma corrente de redução pequena, onde esta reposta é aumentada significativamente até o potencial de 0,2 V, porém após este valor a corrente de

pico aumenta discretamente. Devido a maior seletividade da técnica pela aplicação de potenciais menores de E_c , optou-se por usar o 0,2 V como E_c .

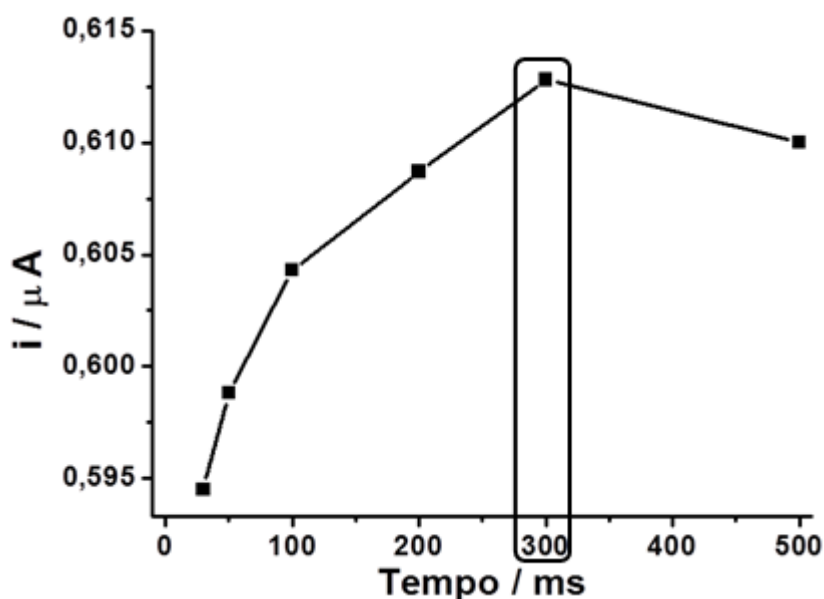
Figura 11- Sinal da corrente de redução do VP 0,1 mmol L⁻¹ (em módulo) em função da variação do pulso de potencial de redução, aplicando o pulso de potencial gerador fixo em 1,6V. Todos os pulsos de potencial foram aplicados no tempo de 100 ms. Vazão 3,0 mLmin⁻¹ Alça 100µL.



4.1.3 Otimização do tempo de aplicação dos potenciais de detecção

Após a otimização dos potenciais gerador e coletor, os tempos de aplicação dos mesmos foram estudados, sendo aplicados os seguintes valores: 30, 50, 100, 200, 300 e 500 ms. Neste estudo, conforme mostrado na Figura 12, foi observado que o aumento do tempo de aplicação do pulso de potencial gerador aumenta a corrente do VP no potencial coletor. Isso ocorre devido à geração de maior número de espécies oxidadas. Porém, a partir do tempo de 300 ms há uma diminuição da corrente de redução, isso pode ter ocorrido devido à perda de espécies geradas em consequência do constante fluxo do sistema FIA. Assim, o tempo de 300 ms para aplicação do potencial gerador foi considerado ideal para se obter uma maior sensibilidade da detecção do fármaco.

Figura 12 - Sinal da corrente de redução do VP 0,1 mmol L⁻¹ (em módulo) em 0,2V/100ms em função do tempo da aplicação do potencial gerador em +1,6 V. Vazão 3,0 mLmin⁻¹ Alça 100μL.



Já é descrito na literatura que em tempos de detecção menores são obtidas maiores correntes de pico no Ec, pois caso contrário o fluxo do sistema FIA pode remover as espécies geradas na superfície do eletrodo (dos SANTOS et al., 2011). Os estudos de tempo de aplicação do potencial coletor realizados corroboram com esta afirmação, no entanto, foi notada uma baixa estabilidade do sinal de corrente no potencial de redução a um tempo de 30 ms (menor tempo aplicado pelo software). Tal observação foi atribuída ao aumento da corrente capacitiva. Com isso foi escolhido um tempo de aplicação do Ec de 100 ms, que apresentou uma sensibilidade satisfatória e uma maior estabilidade de sinal.

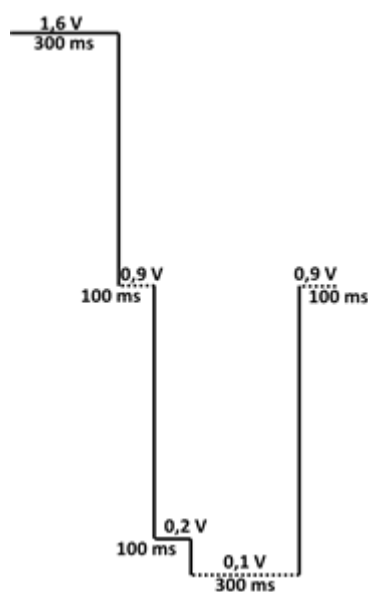
4.1.4 Otimização do potencial e tempo de limpeza

Sucessivas análises de VP mostraram haver uma contaminação ou passivação da superfície do eletrodo, pois havia a diminuição gradativa dos sinais de oxidação e redução. A fim de contornar este problema, foi avaliada a aplicação de um pulso de potencial para fazer a limpeza da superfície do BDD. Potenciais inferiores ao valor do potencial coletor foram aplicados, para que, caso houvesse VP que ainda não tenha sido reduzido em 0,2 V, o produto remanescente não ficasse adsorvido na superfície do eletrodo, causando interferência na análise. Esse estudo foi conduzido por meio de dez injeções consecutivas de uma solução do fármaco à concentração de 0,1 mmol L⁻¹. A aplicação de 0,1 V como potencial de limpeza

resultou na obtenção de um menor desvio padrão relativo (DPR) entre os dez sinais de corrente obtidos e não foi notada uma diminuição significativa do sinal, tendo apenas uma pequena oscilação entre picos. O tempo de aplicação deste potencial também foi estudada numa faixa de 30 a 500 ms, sendo o tempo de 300 ms que apresentou o menor DPR.

Cabe ressaltar que, devido à grande diferença entre os potenciais gerador e coletor, torna-se necessária a aplicação de pulsos de potencial entre estes para que a corrente capacitiva seja minimizada, não comprometendo assim a sensibilidade das análises. Estes potenciais são chamados de potenciais de amortecimento, e não são monitorados no amperograma. Desta forma, um esquema da sequência de potenciais aplicados, de forma cíclica, bem como seus respectivos tempos é mostrada na Figura 13.

Figura 13 - Escada de potenciais aplicados no BDD em função do tempo. (Linhas contínuas são os potenciais mostrados no amperograma e as linhas pontilhadas, os ocultos).



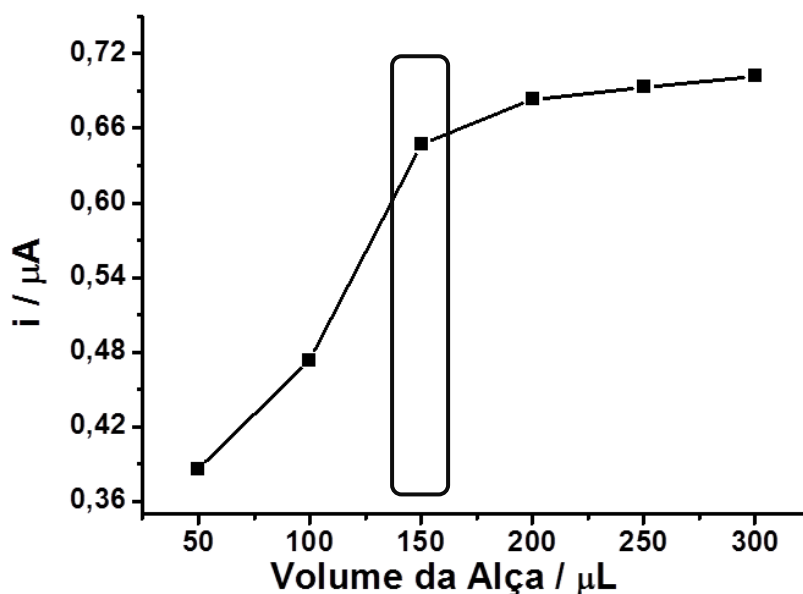
4.1.5 Determinação da vazão e alça de amostragem para detecção FIA-MPA

Os parâmetros de alça de amostragem e vazão do sistema FIA contribuem de forma significativa para a sensibilidade e frequência analítica da metodologia, portanto foram avaliados para obter melhor sinal e garantir uma boa resolução do pico, o qual deve ter no mínimo vinte pontos.

Em relação ao estudo de alça de amostragem, foi observado um aumento dos valores da corrente catódica à medida que o volume de amostra aumentava, mostrado na

Figura 14. Isso ocorre devido ao maior número de espécies geradas no potencial de oxidação quando se tem maiores quantidade de VP injetadas. Só que este aumento não ocorre de forma acentuada após o volume de 150 μL , e assim, este valor foi utilizado devido ao menor consumo de amostra e uma menor possibilidade de contaminação do eletrodo.

Figura 14 - Sinal da corrente de redução do VP $0,1 \text{ mmolL}^{-1}$ (em módulo) em $0,2\text{V}/100\text{ms}$ em função do volume de injeção no sistema FIA. Potencial gerador em $+1,6 \text{ V}/300\text{ms}$ e vazão $3,0 \text{ mL min}^{-1}$.



A vazão do sistema FIA foi avaliada na sequência, foram testadas vazões de: 1,5; 2,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5 mL min^{-1} . Até a vazão de $3,5 \text{ mL min}^{-1}$ houve um aumento da corrente de redução (apresentado na Figura 15), isso pode ser explicado por haver uma diminuição da camada de difusão de Nernst, aumentando a sensibilidade. Após a vazão mencionada a corrente diminuiu, o que pode estar relacionado à remoção das espécies geradas na superfície do BDD em vazões muito altas. Com isso, $3,5 \text{ mL min}^{-1}$ foi a vazão otimizada.

As melhores condições obtidas para a determinação de VP com o sistema FIA-MPA são apresentados na tabela 4.

Figura 15 - Sinal da corrente de redução do VP $0,1 \text{ mmolL}^{-1}$ (em módulo) em $0,2\text{V}/100\text{ms}$ em função da vazão do sistema FIA. Potencial gerador em $+1,6 \text{ V}/300\text{ms}$ e alça de $150\mu\text{L}$.

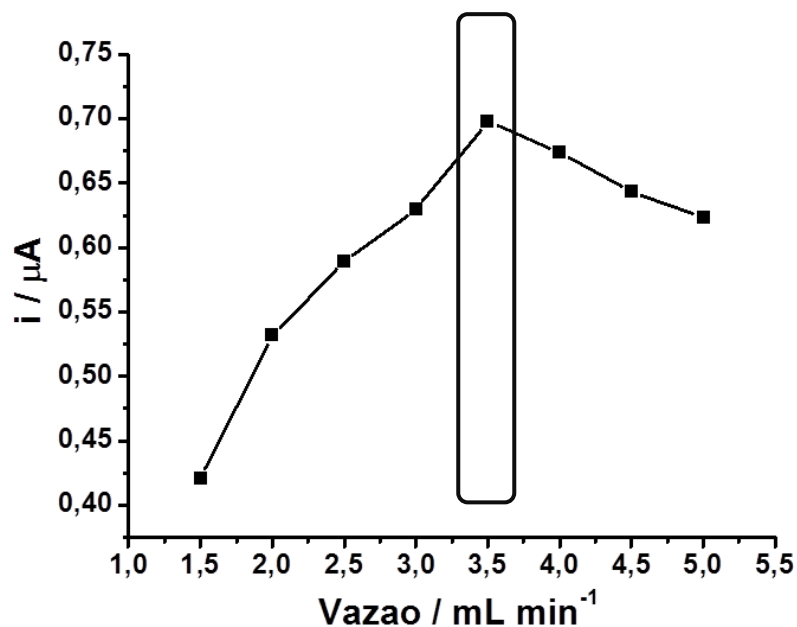


Tabela 4 - Valores otimizados dos parâmetros FIA-MPA para determinação de VP.

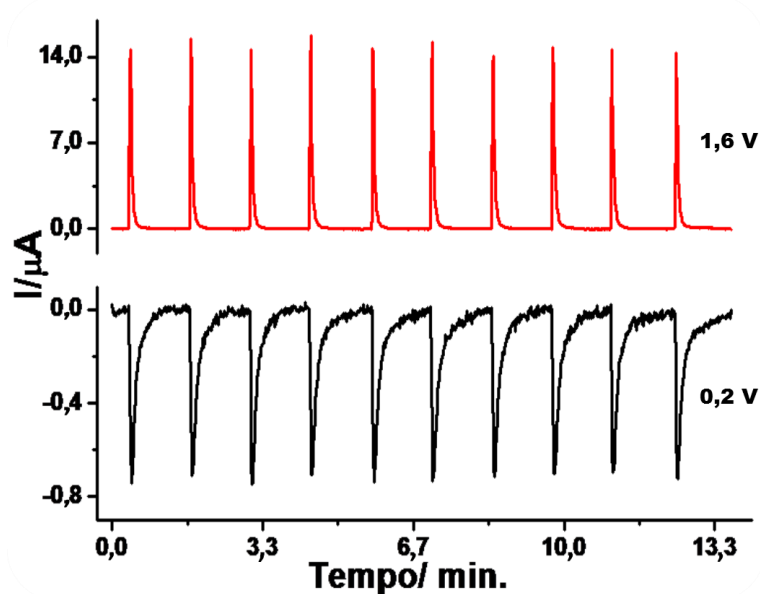
Parâmetro	Valor
Vazão	$3,5 \text{ mL min}^{-1}$
Volume de amostra	$150 \mu\text{L}$
Potencial gerador/tempo de aplicação	$1,6 \text{ V} / 300\text{ms}$
Potencial coletor/tempo de aplicação	$0,2 \text{ V} / 100 \text{ ms}$
Potencial de limpeza/tempo de aplicação	$0,1 \text{ V} / 300 \text{ ms}$

4.1.6 Ensaios de repetibilidade e faixa linear de trabalho

A repetibilidade das análises foi avaliada em função do DPR entre as respostas de corrente de dez injeções consecutivas de VP à concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Os resultados, apresentados na Figura 16, confirmaram elevada precisão para os dois potenciais de detecção, obtendo DPR de 2,2% para 1,6 V e 1,9% para 0,2 V.

O baixo DPR pode ser atribuído ao uso do BDD, eletrodo altamente estável, pelo fluxo constante de eletrólito devido ao sistema FIA e ao método MPA pela possibilidade de aplicação de potenciais de limpeza, fazendo com que o uso deste sistema diminua significativamente a contaminação ou passivação da superfície do eletrodo.

Figura 16 - Amperogramas de 10 injeções consecutivas de solução de VP $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Alça de $150 \text{ } \mu\text{L}$ e vazão de $3,5 \text{ mL min}^{-1}$.



Nas condições de análise mostradas, obteve-se uma frequência analítica de aproximadamente 45 injeções de amostra por hora.

Na sequência foram estudadas as faixas lineares de trabalho para a determinação de VP em amostras farmacêuticas e de urina. As curvas de regressão linear foram geradas a partir das médias das correntes de pico de cada injeção, em triplicata, de padrões do fármaco em concentrações variando desde a menor concentração detectada de $0,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ até $40,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

O FIAgrama com as curvas de calibração são mostrados na Figura 17. Como pode ser observado, ambos os potenciais de detecção resultaram em curvas com bons coeficientes

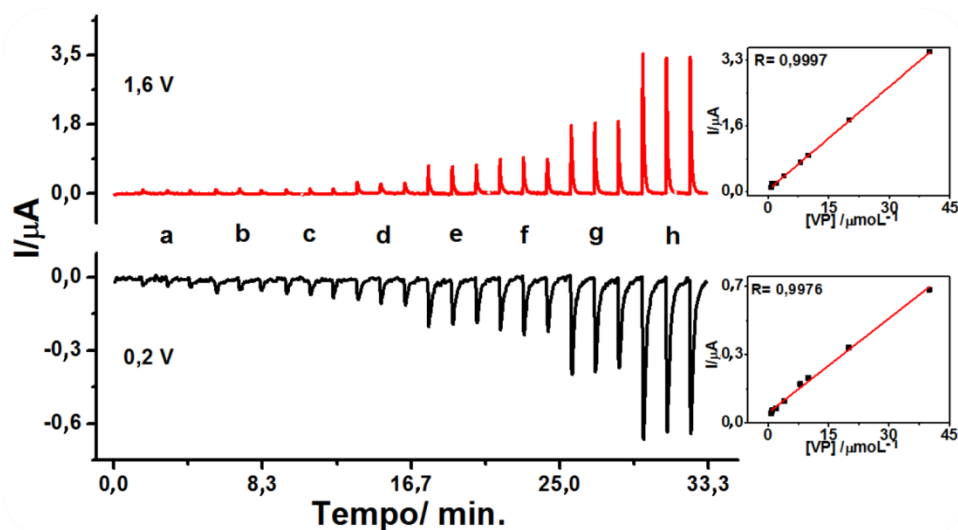
de correlação linear (R), no intervalo de concentração de 0,8 a 40,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, o que mostra que as condições são satisfatórias para a determinação do fármaco. As equações das curvas obtidas foram, para o potencial de 1,6 e 0,2 V, respectivamente:

$$i / \mu\text{A} = -0,2143 (\pm 0,03273) + 0,09432 (\pm 0,009110) [\text{VP}] / \mu\text{mol L}^{-1} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$i / \mu\text{A} = 0,05717 \pm (0,01664) + 0,01493 \pm (0,001030) [\text{VP}] / \mu\text{mol L}^{-1} \quad (\text{Eq. 2})$$

Com base no amperograma da Figura 17 também foi calculado o LD, conforme informado na parte experimental. Os valores do LD obtidos foram de 0,07 e 0,16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para os potenciais de oxidação e redução, respectivamente.

Figura 17 - FIAgramas e respectivas curvas de calibração obtidas por FIA-MPA sobre eletrodo de DDB em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} com a injeção de soluções padrão contendo 0,8 (a), 1,0 (b), 2,0 (c), 4,0 (d), 8,0 (e), 10,0 (f), 20,0 (g) e 40,0 (h) $\mu\text{mol L}^{-1}$ de VP. Alça de 150 μL e vazão de 3,5 mL min^{-1} .



4.1.7 Validação da metodologia

A validação da metodologia proposta para aplicação em formulações farmacêuticas foi feita através do estudo de adição e recuperação e comparação do doseamento do VP nas formulações farmacêuticas obtido pelo método proposto e pelo método oficial (UV). Esses resultados são apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Resultados dos estudos de adição e recuperação na amostra farmacêutica de VP no Ec. Os estudos foram feitos em triplicata e o desvio padrão apresentado após sinal \pm .

Amostra	Adição ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
1	8,00	$7,88 \pm 0,09$	98,5
2	10,00	$9,75 \pm 0,07$	97,5

Os estudos de adição e recuperação nas amostras apresentaram recuperação próxima a 100%, conforme mostrado na Tabela 5. Estes resultados implicam que a metodologia utilizada é eficiente na determinação de VP em amostras farmacêuticas não apresentando efeito de matriz, ou seja, os excipientes presentes não interferem na determinação e quantificação da VP.

Tabela 6 - Doseamento de VP por FIA-MPA e UV. Os estudos foram feitos em triplicata e o desvio padrão é apresentado após sinal \pm .

VP rotulado (mg)	Doseamento FIA-MPA (mg)	Doseamento UV (mg)
240,00	$241,70 \pm 0,90$	$243,63 \pm 0,70$

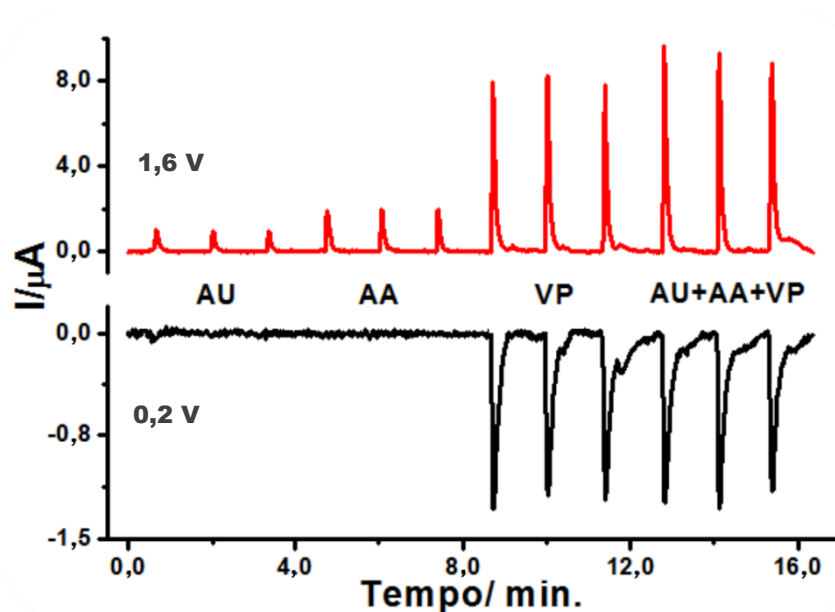
As médias dos valores determinados pelo método proposto e pelo método oficial, para análises em triplicata do medicamento e os desvios padrão referentes a estes procedimentos são apresentados na Tabela 6. Como observado nesta tabela, a quantidade de VP nos comprimidos encontrada por ambos os métodos está bem próxima se comparada à informada pelo fabricante. Para confirmar a semelhança entre os resultados obtidos pelo método proposto e por UV, foram aplicados os testes estatísticos t e F sobre esses dados. Os resultados obtidos por ambos os testes, apresentaram valores críticos menores que os tabelados, a um nível de confiança de 95%, indicando que os resultados obtidos e as variâncias das duas metodologias são semelhantes. Desta forma, o doseamento por FIA-MPA oferece resultados confiáveis e sendo assim, pode ser adotada no controle de qualidade de rotina desse medicamento.

4.1.8 Avaliação de interferência de ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU) para a determinação em urina

Como apresentado na Figura 9, os principais interferentes para análises em urina, são o AA e AU, pois apresentam potenciais de oxidação próximos aos do VP, e estes não apresentam processos de redução no BDD. O que desperta interesse na determinação VP no fluído através do seu processo catódico.

Foi então avaliado se esses ácidos apresentavam alguma interferência na quantificação do fármaco. A Figura 18 apresenta o amperograma onde foram injetadas soluções à concentração de $0,1 \text{ mmolL}^{-1}$ de: AU, AA, VP e a mistura dos três compostos (em triplicata). Nota-se que houve uma diferença desprezível, de apenas 1,4 % na corrente do VP e da mistura no potencial de redução.

Figura 18 - Amperogramas de soluções de: Ácido Úrico (AU), Ácido Ascórbico (AA), VP e mistura dos três à $0,1 \text{ mmolL}^{-1}$. Como eletrólito suporte o Ácido sulfúrico $0,1 \text{ molL}^{-1}$. Alça de $150 \mu\text{L}$ e vazão de $3,5 \text{ mL min}^{-1}$.



Diante disso, avaliou-se a interferência no sinal do fármaco em concentrações crescentes dos interferentes, pois estes estarão presentes na amostra em quantidade superiores ao VP. Estes estudos foram realizados separadamente com o objetivo de estabelecer o limite em que a interferência de cada um desses compostos pode ser desprezada. Esses estudos estão apresentados nas Tabelas 7 e 8, nas quais é mostrada a variação média do sinal do VP em porcentagem após injeções em triplicata contendo concentrações crescentes dos interferentes.

Tabela 7 - Estudo da interferência de AA no sinal do VP a $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ obtido no pulso de 0,2 V/100 ms.

Proporção molar VP/AA	Sinal do VP (%)
1: 0	100,0
1:5	103,4
1:10	101,8
1:50	99,6
1:100	98,5
1:500	110,0

Tabela 8 - Estudo da interferência de AU no sinal do VP a $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ obtido no pulso de 0,2 V/100 ms.

Proporção molar VP/AU	Sinal do VP (%)
1: 0	100,0
1:1	102,9
1:5	99,8
1:10	104,4
1:50	102,5
1:100	108,3

Com os resultados apresentados nas tabelas 7 e 8, observa-se que não houve nenhuma variação acentuada do sinal do VP para a presença de até 100 vezes mais de AA e 50 vezes mais que AU, considerando que uma diferença de até 5% não altera significativamente as análises. Sendo assim, a metodologia proposta funciona apenas em amostras de urina em que o paciente excretar os interferentes em proporções inferiores às definidas. Após o estudo realizado sobre a interferência de AA e AU na determinação do fármaco, foi realizado a análise de adição e recuperação de padrão de VP na amostra de urina (tabela 9).

Tabela 9 - Estudos de adição e recuperação de VP em amostra de urina diluída 100 vezes. Estudos foram feitos em triplicata e o desvio padrão é apresentado após sinal \pm . Sinais obtidos no pulso de 0,2 V/100 ms.

Amostra	Adição ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
1	10,0	$10,3 \pm 0,1$	102,5
2	20,0	$19,4 \pm 0,1$	96,8

Os estudos de adição e recuperação obtidos foram satisfatórios, conforme é mostrado na Tabela 9, indicando uma ausência do efeito de matriz nesta amostra pelo método proposto.

4.1.9 Comparação entre parâmetros analíticos dos métodos eletroquímicos da literatura e o FIA-MPA proposto

Foi feita a comparação dos parâmetros analíticos dos métodos eletroquímicos encontrados na literatura com a metodologia proposta por FIA-MPA. Os parâmetros analisados foram: DRP, LD, faixa linear e tipo de amostra aplicada para a determinação de VP, como apresentado na tabela 10.

Nesta tabela, observa-se que os valores obtidos por FIA-MPA estão entre os encontrados na literatura. Cabe ressaltar, que o eletrodo de BDD utilizado nas análises não é modificado como a maioria dos citados na literatura, o que oferece uma maior simplicidade na aplicação do método.

Outra vantagem do método FIA-MPA é a possibilidade de determinar a pureza do fármaco nas amostras, utilizando a razão do sinal obtido no potencial gerador e coletor, conforme já relatado para outros fármacos por Lima e colaboradores, como no caso da Nimesulida (LIMA *et al.*, 2013).

Tabela 10 - Comparação dos parâmetros analíticos obtidos pelo método proposto e outros métodos eletroanalíticos descritos na literatura para a determinação de VP.

Técnica	Eletrodo de trabalho	Faixa linear (μmolL^{-1})	LD (μmolL^{-1})	DPR (%)	Amostras	Referência
VRA ¹	Hg gota pendente	0,01 a 1,00	5×10^{-4}	1,8 (n=5)	Formulações e urina	KASIM et al., 2002
VPD ² e VOQ ³	Carbono vítreo	0,8 a 100,0	0,16	1,15 (n=8)	Formulações e soro	DEMIRCAN; KIR; OZKAN, 2007
Amperometria em fluxo	Membrana de PVC	5,0 a 100,0	11,0	0,2 (n=3)	Formulações e urina	ORTUÑO; SÁNCHEZ-PEDREÑO; GIL, 2005
VPD ² e VOQ ³	eletrodo de grafite/políuretano	2,0 a 30	0,7	-	Formulações	SEMAAN; CAVALHEIRO ; BRETT, 2009
VPD ² e VOQ ³ /RA ⁴	MWCNTsPAH/GCE ⁵	0,005 a 0,11	0,0036	4,8 (n=10)	Formulações	OLIVEIRA et al., 2013
Voltametria cíclica	GNEE ⁶	0,0022 a 220,0	0,0022	-	Formulações e em soro	CHEN et al., 2013
FIA-MPA	BDD	0,8 a 40,0	0,16	2,2 (n=10)	Formulações e urina	Este trabalho

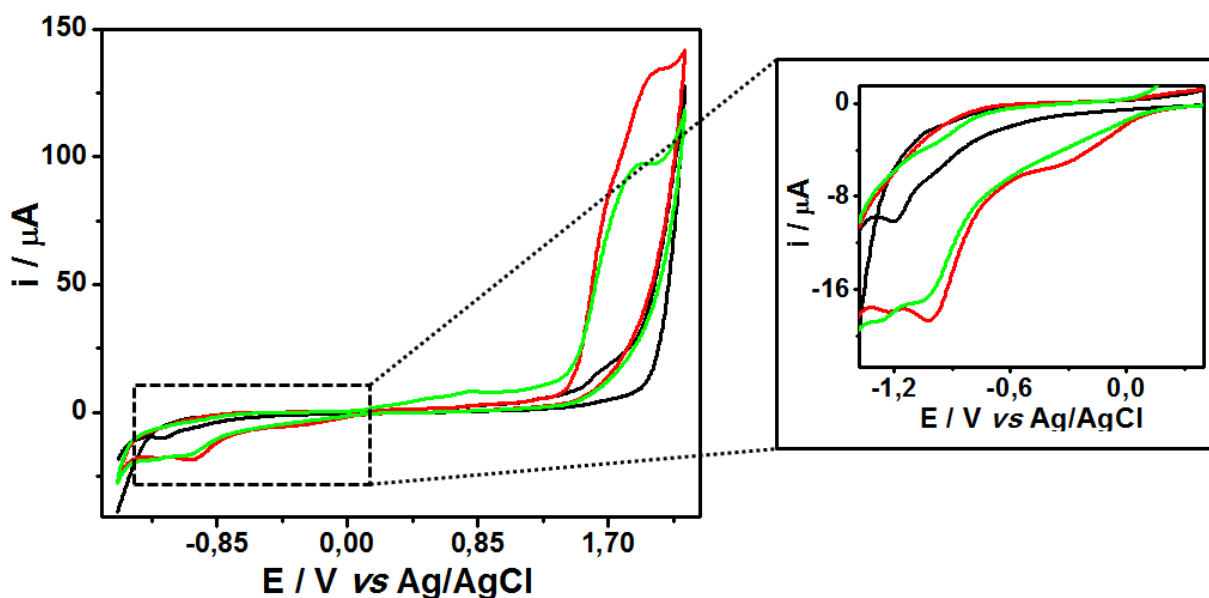
¹ VRA: Voltametria de redissolução adsortiva. ² VPD: Voltametria de pulso diferencial. ³ VOQ: Voltametria de onda quadrada. ⁴ RA: Redissolução anódica. ⁵ MWCNTsPAH/GCE: multiwalled carbon nanotubes within a poly (allylamine hydrochloride)/glassy carbon electrode (Nanotubos de carbon de paredes múltiplas com poli hidrocloreto de alilamina/eletrodo de carbono vítreo. ⁶ GNEE: gold nanoelectrode ensemble electrode (nanoeletrodo de ouro)

4.2 Oxcarbazepina

4.2.1 Comportamento eletroquímico da Oxcarbazepina

Assim como descrito na parte experimental, o comportamento eletroquímico da OX foi avaliado por meio da voltametria cíclica em diversos eletrólitos suporte, sobre BDD. O fármaco apresentou processos de oxidação em todos os pHs estudados e processos de redução em pHs de 3,0 a 10,0. A resposta eletroquímica com maior intensidade de corrente e com melhor definição para os picos de oxidação e redução foi encontrada no pH 4,0. Neste pH, o tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ apresentou melhores resultados e foi utilizado para as análises posteriores. Nessas condições de eletrólito, a OX apresentou um processo de oxidação em torno de 1,9 V e dois processos de redução: um em -0,2 V e outro em -1,0 V. A Figura 19 apresenta esses processos e os resultados obtidos na avaliação da influência do tratamento eletroquímico da superfície do eletrodo de BDD sobre o perfil dos respectivos processos redox da OX.

Figura 19 - Voltamogramas cíclicos do tampão acetato (pH 4,0) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (linha preta) com adição do OX $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ após o tratamento anódico (linha verde) e após tratamento catódico (linha vermelha). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Em destaque, o processo de redução da OX.

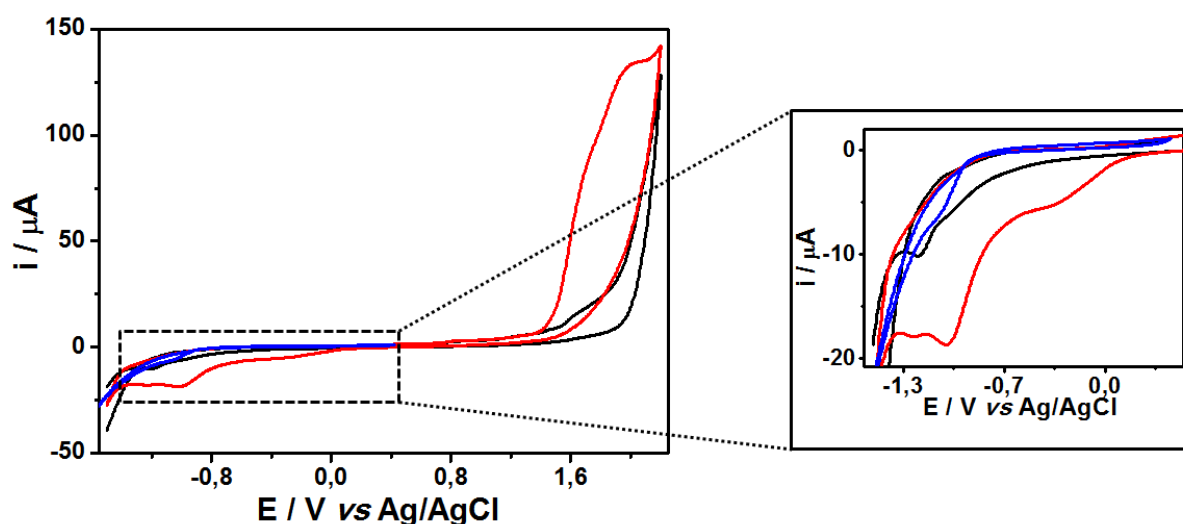


Como pode ser observado na Figura 19, após o tratamento anódico notou-se o surgimento de um pico de oxidação em torno de 0,85 V, em contrapartida, o tratamento catódico, intensificou bastante a corrente do pico de oxidação e, discretamente, a corrente dos picos de redução apresentados pela OX no eletrodo de BDD. Por este motivo, o tratamento

catódico foi adotado para sequência de desenvolvimento da metodologia, uma vez que os processos catódicos serão utilizados para quantificação deste fármacos nas amostras.

A dependência dos processos eletroquímicos foi avaliada conforme apresentado na Figura 20. O estudo mostrou que o pico catódico é dependente do anódico, visto que se o fármaco não é submetido a varredura que atinge os potenciais de oxidação da OX, o sinal de redução não é observado na varredura inversa.

Figura 20- Voltamogramas cíclicos do tampão acetato $0,1\text{mol L}^{-1}$ pH 4,0 (linha preta) com adição do OX $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ com varredura até o potencial de 2,2 V (linha vermelha) e com varredura até o potencial de 0,4 V (linha azul). Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Em destaque, região que ocorre o processo de redução da OX.



O mecanismo de oxidação e redução da OX ainda não foi estudado no presente trabalho. No entanto, Abolhasani e colaboradores (2014), em estudos com eletrodo de carbono vítreo, sugerem que o processo de oxidação do fármaco envolva quatro elétrons e dois prótons. Segundo os autores, este processo ocorre no átomo de nitrogênio no anel central, que resulta formação de carbocátions. No trabalho dos autores, a OX não apresentou processo de redução, mas em outros trabalhos utilizando o eletrodo de mercúrio (CALVO; RENEDO; MARTÍNEZ, 2007) e carbono vítreo (APAYDIN et al., 2015; NOSAL-WIERCIŃSKA et al., 2014) um processo de redução foi observado. No entanto, apenas APAYDIN e colaboradores (2015) discutem o mecanismo de redução da OX, que segundo esses autores pode ocorrer de duas maneiras, sobre um eletrodo de carbono vítreo modificado com filme eletropolimerizado de ácido p-aminobenzeno, sendo a primeira relacionada à redução do grupo carbonila, ganhando dois prótons e dois elétrons, formando o composto hidroxycarbazepina. Já no segundo mecanismo proposto, o grupo amida do composto também

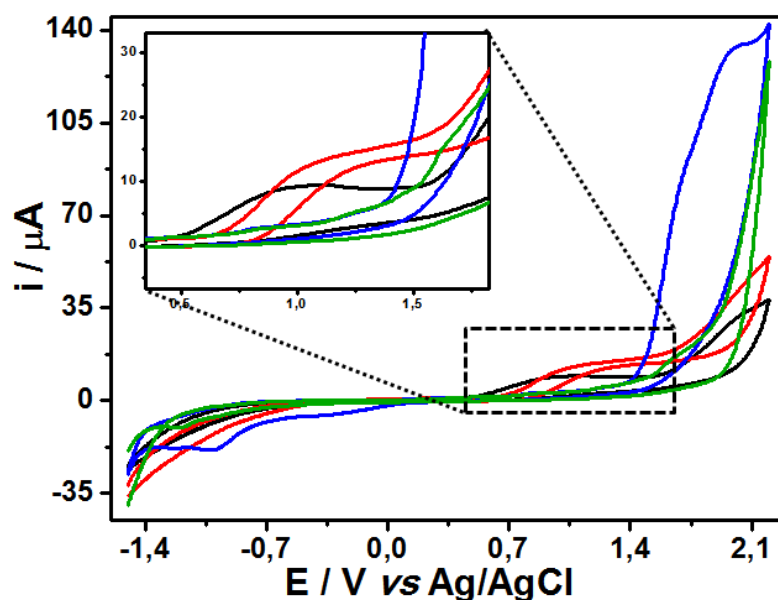
é reduzida ganhando dois prótons e dois elétrons, sendo transformado em metilamina-oxcarbazepina.

Cabe destacar que, no eletrodo de BDD o processo de redução só ocorre após o processo de oxidação.

4.2.2 Determinação dos pulsos de potencial e tempos de aplicação

A avaliação dos pulsos de potencial para detecção da OX foi conduzida a fim de obter melhor sensibilidade no potencial em que não há interferência de AA e AU, ou seja, no E_c , assim como ocorreu por VP. Aplicando um pulso no E_g e depois outro no E_c para quantificar a OX, como pode ser visto na Figura 21, os ácidos não seriam interferentes no eletrodo BDD.

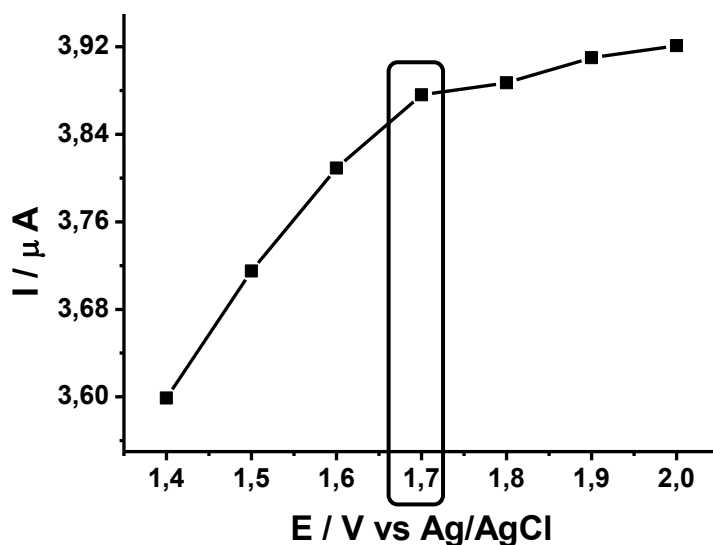
Figura 21 - Voltamogramas cíclicos do tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 sob eletrodo de BDD (linha verde) com adição das espécies: OX $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (linha azul), AA $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (linha preta) e AU $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (linha vermelha). Velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} . Em detalhe os picos de oxidação do AA e do AU.



Deste modo, os estudos para otimização dos potenciais E_g e E_c na MPA foram conduzidos em duas etapas, sendo que a primeira foi para determinação do E_g , que foi aplicado a fim de gerar espécies a serem reduzidos posteriormente no E_c . Os pulsos de E_g

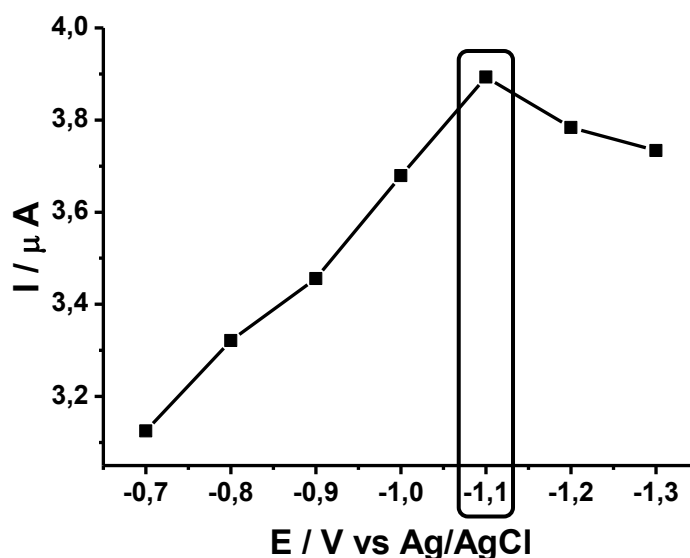
aplicados foram: 1,4; 1,5; 1,6; 1,7, 1,8, 1,9 e 2,0 V, sendo que todos estes foram aplicados separadamente, e com o E_c fixado em -1,0 V. Esse estudo é mostrado no gráfico da Figura 22.

Figura 22 - Sinal da corrente de pico de redução da OX (em módulo) em -1,0 V em função da variação do potencial de oxidação (gerador). Todos os pulsos de potencial foram aplicados no tempo de 100 ms. Alça de 100 μL e vazão de 3,0 mL min^{-1} .



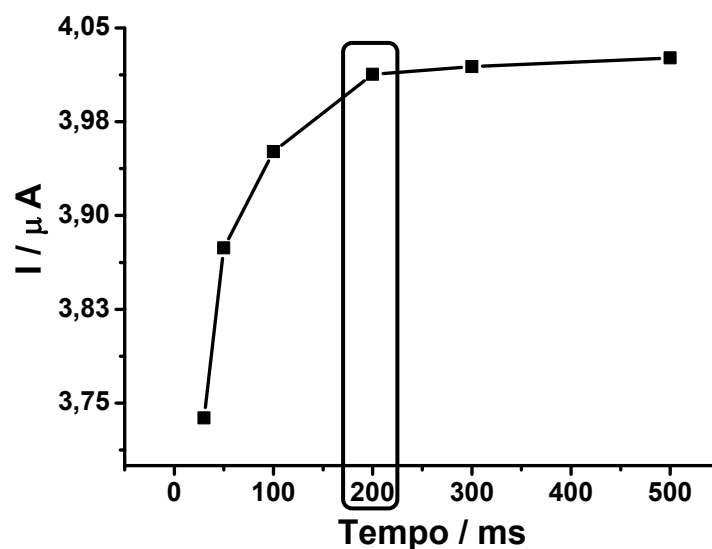
Observa-se na Figura 22 que o sinal de corrente do E_c aumentou significativamente até a aplicação do potencial de 1,7 V. Como após este valor, não houve melhora significativa na corrente de pico do E_c , o 1,7 V foi o potencial utilizado como E_g . O E_c foi avaliado apenas na região do pico de redução de maior magnitude (em torno de -1,0 V), isso porque favorece a obtenção de melhores LDs o que melhora a quantificação do fármaco. Nessa análise manteve-se fixo o E_g escolhido previamente (1,7 V) e os E_c testados foram: -0,7; -0,8; -0,9; -1,0; -1,1; -1,2 e -1,3 V. Como observado na Figura 23, a corrente de pico máxima foi obtida em -1,1 V e em seguida houve um decréscimo da corrente em potenciais inferiores a este, provavelmente, devido ao aumento da corrente capacitiva. Dessa forma, o pulso de E_c escolhido foi em -1,1 V.

Figura 23 - Sinal da corrente de redução da OX (em módulo) em função da variação do pulso de potencial de redução, aplicando o pulso de potencial gerador fixo em 1,7 V. Todos os pulsos de potencial foram aplicados no tempo de 100 ms. Alça de 100 μL e vazão de 3,0 mL min^{-1} .



Os tempos de aplicação avaliados para os pulsos de potencial foram os seguintes: 30, 50, 100, 200, 300 e 500 ms. Como o objetivo era gerar o máximo de espécies possíveis para serem reduzidas, o tempo de aplicação do E_g foi otimizado em 200 ms, valor que possibilitou a geração de mais espécies a serem reduzidas em -1,1 V. A geração dessas espécies em tempos maiores não obteve grande melhora da sensibilidade, conforme observado na Figura 24.

Figura 24- Sinal da corrente de redução da OX (em módulo) em -1,1V/100ms em função do tempo da aplicação do potencial gerador em +1,7 V. Alça de 100 μL e vazão de 3,0 mL min^{-1} .

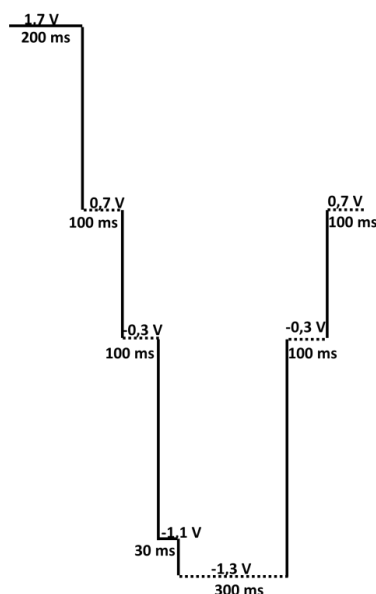


Como descrito na literatura (dos SANTOS et al., 2011) e citado na parte I do trabalho, o tempo de aplicação potencial coletor foi fixado no menor tempo, no caso de 30 ms, por apresentar maior corrente de pico, evitando uma possível lixiviação dos produtos pelo fluxo.

O melhor potencial de limpeza, assim como seu tempo de aplicação, para uma limpeza eficiente e reativação da superfície do eletrodo de DDB foram avaliados em busca da maior repetibilidade do método proposto. Para tanto, foram realizadas, consecutivamente, 10 injeções de amostras de OX $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Além dos pulsos de Eg e Ec, os seguintes pulsos de potencial foram avaliados para limpeza do BDD em -1,2; -1,3; -1,4 e -1,5 V, todos avaliados individualmente. O menor DPR foi obtido com o potencial de -1,3 V, sendo este utilizado para a limpeza do eletrodo. Na sequência foi estudado o tempo de duração deste pulso de potencial para limpeza (-1,3 V), sendo este parâmetro otimizado também com base no DPR de 10 injeções consecutivas de OX na mesma concentração. O tempo foi variado de 30 a 500 ms e notou-se que houve uma pequena diferença entre os DPR obtidos para as respostas em cada tempo de aplicação do pulso de potencial. Logo optou-se por manter o tempo de 300 ms, que foi o que possibilitou melhor reativação da superfície do BDD.

Outros potenciais que foram aplicados são os de amortecimento, como também ocorreu no caso do VP. Estes potenciais de amortecimento são necessários devido ao aumento da corrente capacitiva provocado pela grande diferença entre o pulso de potencial anódico e catódico, porém ainda mais pronunciado no caso da OX, onde os saltos de potencial são ainda maiores. Cabe lembrar, que as correntes nestes potenciais não são monitoradas no sistema de detecção. A Figura 25 apresenta um esquema da sequência de potenciais aplicados, de forma cíclica, e seus respectivos tempos de aplicação.

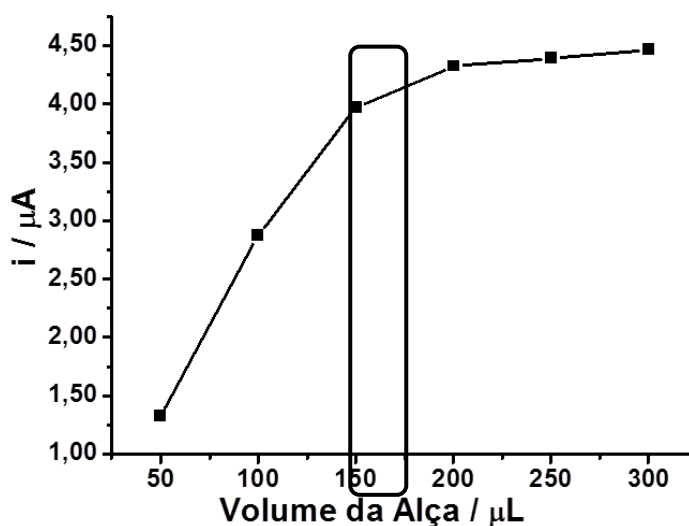
Figura 25 - Escada de potenciais aplicados no BDD em função do tempo. (Linhas contínuas são os potenciais mostrados no amperograma e as linhas pontilhadas, os ocultos).



4.2.3 Determinação da alça de amostragem e vazão do sistema FIA

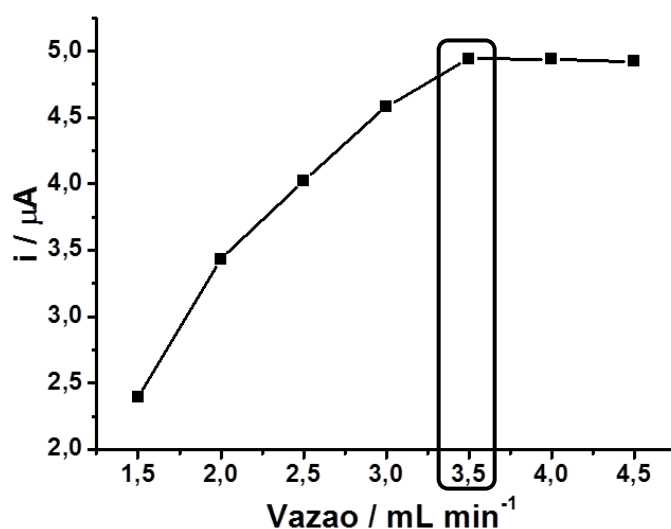
A otimização do volume da amostra e da vazão do sistema foi realizada de forma a conseguir condições de melhor sensibilidade, frequência analítica e reprodutibilidade do sinal. O volume de amostra foi variado em valores de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 μL . O aumento da alça de amostragem favoreceu maiores valores da corrente catódica, pois aumentou a geração de produto a ser reduzido no E_c , como apresentado na Figura 26. Porém a contribuição do volume injetado não foi significativa para o aumento da corrente catódica no E_c após o volume de 200 μL , sendo assim este valor foi mantido nas análises posteriores.

Figura 26 - Sinal da corrente de redução da OX 0,1 mmolL⁻¹(em módulo) em -1,1V/30ms em função do volume de injeção no sistema FIA. Potencial gerador em +1,7 V/200ms e vazão 3,0 mL min⁻¹.



As vazões avaliadas foram 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 mL min⁻¹, sendo que a resposta do potencial coletor foi crescente até 3,5 mL min⁻¹ e após este valor obteve leve queda, que pode ser gerada devido ao produto da oxidação ser retirado da superfície do eletrodo antes de ser detectado (Figura 27).

Figura 27 - Sinal da corrente de redução da OX 0,1 mmolL⁻¹(em módulo) em -1,1V/30ms em função da vazão do sistema FIA. Potencial gerador em +1,7 V/200ms e alça de 200µL.



As melhores condições para determinação de OX obtidas para o sistema FIA-MPA são apresentados na tabela 11.

Tabela 11 - Valores otimizados dos parâmetros FIA-MPA para determinação de OX

Parâmetro	Valor
Vazão	3,5 mL min ⁻¹
Volume de amostra	200 µL
Potencial gerador/tempo de aplicação	1,7 V / 200ms
Potencial coletor/tempo de aplicação	-1,1 V / 30 ms

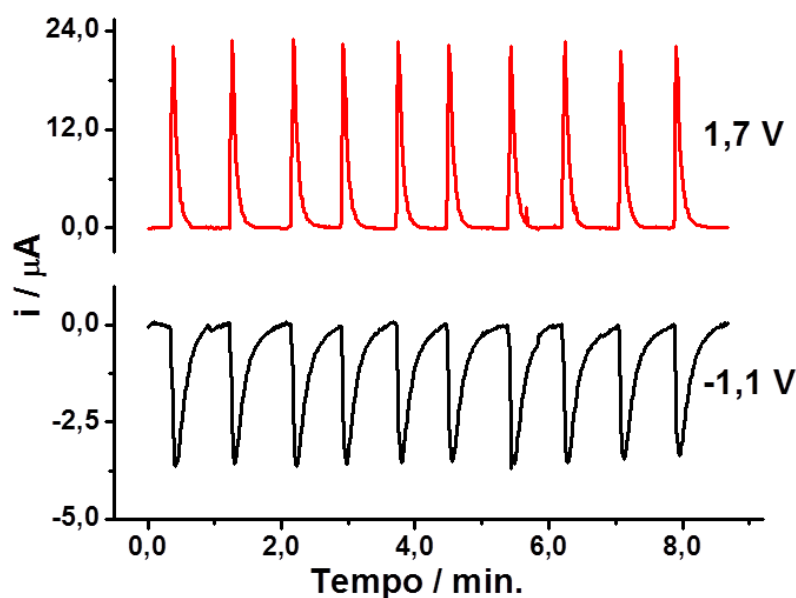
Potencial de
limpeza/tempo de aplicação

-1,3 V / 300 ms

4.2.4 Repetibilidade e faixa linear de trabalho

Com todas as condições da metodologia otimizadas, a repetibilidade analítica foi avaliada em função do DPR entre as respostas obtidas frente a 10 injeções consecutivas de OX à concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Os resultados confirmaram elevada precisão analítica para os dois potenciais de detecção, obtendo DPR de 0,86% para 1,7 V e 0,94% para -1,1 V, como pode ser observado na Figura 28. Estes valores mostram que o sistema de detecção FIA-MPA usando o eletrodo de BDD apresenta também elevada precisão analítica para determinação de OX, como foi para VP, sendo as justificativas as mesmas abordadas anteriormente. Nessas condições, foi obtida uma frequência analítica de aproximadamente 65 injeções por hora.

Figura 28 - Amperogramas de 10 injeções consecutivas de solução de OX $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0). Alça $200 \text{ } \mu\text{L}$ e vazão $3,5 \text{ mL min}^{-1}$.



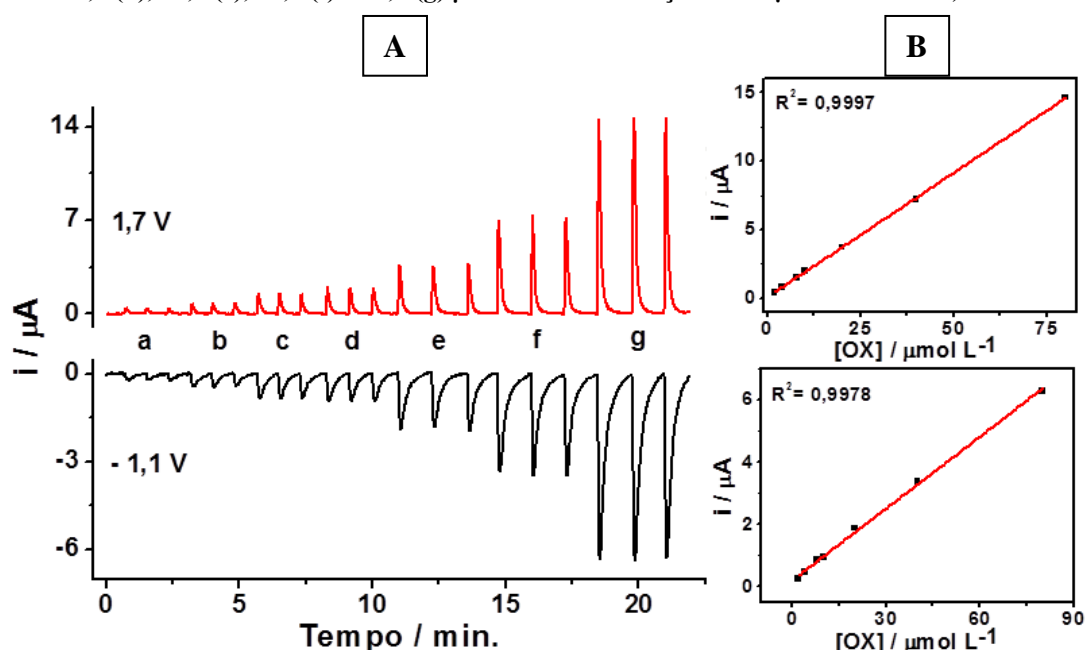
A fim de avaliar as faixas lineares de trabalho da OX, foram injetadas soluções padrão da menor concentração detectável de $2,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ até $80,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. As curvas de regressão linear foram geradas a partir das médias das correntes de pico de cada injeção, em triplicata. Assim como observado na Figura 29B, excelentes valores de R foram obtidos, para

ambos os potenciais de detecção, no intervalo de concentração avaliado, a partir das correntes de pico exibidas no FIAGrama da Figura 29A. As equações das curvas obtidas foram para o potencial de 1,7 e -1,1 V, respectivamente apresentadas a seguir:

$$i / \mu\text{A} = 0,09902 (\pm 0,04135) + 0,1810 (\pm 0,001180) [\text{OX}]/\mu\text{molL}^{-1} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$i / \mu\text{A} = 0,2105 (\pm 0,05067) + 0,07700 (\pm 0,001450) [\text{OX}]/\mu\text{molL}^{-1} \quad (\text{Eq. 4})$$

Figura 29 - FIAGramas e respectivas curvas de calibração obtidas por FIA-MPA sobre eletrodo de DDB em meio de acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,0 com a injeção de soluções padrão contendo 2,0 (a), 4,0 (b), 8,0 (c), 10,0 (d), 20,0 (e), 40,0 (f) e 80,0 (g) μmolL^{-1} de OX. Alça de 200 μL e vazão de 3,5 mL min⁻¹.



Os valores do LD obtidos foram de 0,17 e 0,42 μmolL^{-1} para os potenciais de oxidação e redução, respectivamente.

4.2.5 Comparação entre parâmetros analíticos dos métodos eletroquímicos da literatura e o FIA-MPA proposto

Os parâmetros analíticos, como: DPR, LD, faixa linear e tipo de amostra aplicada, dos métodos eletroquímicos encontrados na literatura foram comparados com a metodologia proposta por FIA-MPA, como apresentado na Tabela 12.

Nota-se que a metodologia proposta para a determinação de OX apresenta bons resultados frente às demais. Cabe ressaltar que o eletrodo de BDD utilizado não é modificado,

o que simplifica a análise. Além disso, a utilização de um sistema em fluxo trás a possibilidade de automação, menor contato do analista com as amostras e principalmente, uma maior frequência analítica.

Tabela 12 - Comparação dos parâmetros analíticos obtidos pelo método proposto e outros métodos eletroanalíticos descritos na literatura para a determinação de OX.

Técnica	Eletrodo de trabalho	Faixa linear (μmolL^{-1})	LD (μmolL^{-1})	DPR (%)	Amostras	Referência
VOQ-RA ¹	Hg gota pendente	0,3 a 1,7	0,174	1,18 (n=8)	Formulações	CALVO; RENEDO; MARTÍNEZ, 2007
VPD ²	Carbono vítreo/ p-ABSA ³	0,6 a 10,0	0,127	3,54% (n=20)	Formulações	APAYDIN et al., 2015
VPD ²	Carbono vítreo	2,0 a 23,0	0,81	3,23 (n=5)	Formulações e plasma	ABOLHASANI ; HOSSEINIB; KHANMIRIB, 2014
VPD ²	Carbono vítreo	8,0 a 100,0	1,65	2,43 (n=5)	Formulações e urina	NOSAL-WIERCIŃSKA et al.,2014
FIA-MPA	BDD	2,0 a 80,0	0,42	0,94 (n=10)	Formulações e urina	Este trabalho

¹ VOQ-RA: Voltametria de onda quadrada com redissolução anódica. ² VPD: Voltametria de pulso diferencial.

³ p-ABSA: *p*-aminobenzene sulfonic acid (*p*-aminobenzeno ácido sulfônico).

4.2.6 Validação da metodologia

Para validar a metodologia proposta para a determinação do fármaco, foi utilizado um estudo de adição e recuperação em amostras farmacêuticas. Os resultados obtidos desse estudo são apresentados na Tabela 13, onde pode ser observado que as recuperações ficaram próximas a 100%. Isto evidencia que não há efeito da matriz da amostra na determinação do fármaco.

Tabela 13 - Resultados dos estudos de adição e recuperação na amostra farmacêutica de OX. Os estudos foram feitos em triplicata e o desvio padrão apresentado após sinal \pm . Análises realizadas em -1,1 V/30 ms.

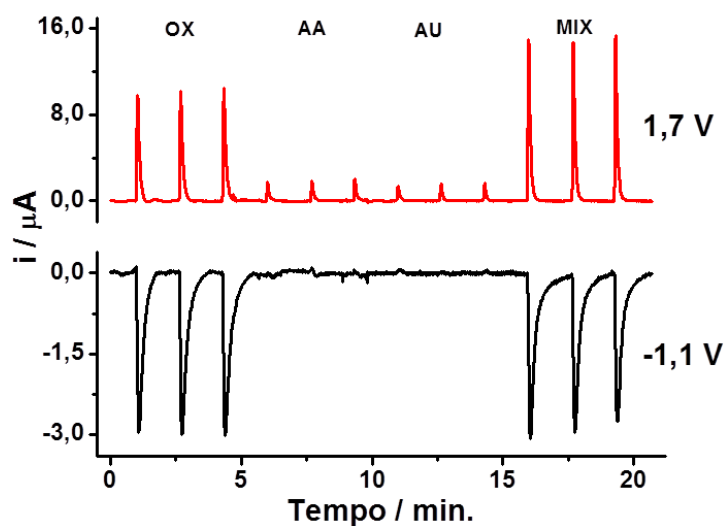
Amostra	Adição ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
1	10,00	$10,16 \pm 0,13$	101,50
2	20,00	$19,65 \pm 0,37$	98,25

4.2.7 Avaliação da interferência de ácido ascórbico e ácido úrico na análise de Oxcarbazepina na urina

O fato da OX apresentar um processo de redução desperta interesse da sua determinação em urina, como no caso do VP. Isso porque os principais interferentes para análises em urina, AA e AU, não apresentam processos de redução no BDD. Por este motivo, a princípio, a detecção amperométrica do analito pode ser viável através da aplicação de pulsos de potencial catódicos pela MPA. Neste contexto, foram realizados experimentos no intuito de avaliar o nível de interferência dos AA e AU na determinação do fármaco em urina e estabelecer as condições para análises nesse tipo de amostra.

Primeiramente, soluções de mesma concentração de OX, AA, AU e a mistura dos três compostos foram injetadas em triplicata e os sinais são apresentados na Figura 30. Uma diferença de apenas 1,4 % na corrente da OX e da mistura dos compostos no potencial de redução foi observada, o que mostra que os ácidos não são interferentes no potencial de catódico otimizado.

Figura 30 - Amperogramas de soluções de: Ácido Úrico (AU), Ácido Ascórbico (AA), OX e mistura dos três à $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Como eletrólito suporte o tampão acetato pH 4,0 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Vazão $3,5 \text{ mL min}^{-1}$ e alça $200 \mu\text{L}$.



Após o estudo realizado sobre a interferência de AA e AU na determinação do fármaco, foi realizado a análise de adição e recuperação de padrão de OX na amostra de urina (tabela 14).

Tabela 14 - Estudos de adição e recuperação de OX em amostra de urina diluída 100 vezes. Estudos foram feitos em triplicata e o desvio padrão é apresentado após sinal \pm . Análises realizadas em $-1,1 \text{ V}/30 \text{ ms}$.

Amostra	Adição ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
1	4,0	$3,9 \pm 0,6$	97,5

O resultado da recuperação na amostra de urina apresentado na Tabela 14 mostra-se satisfatório, indicando uma ausência do efeito de matriz nesta amostra pelo método proposto.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou um método eletroanalítico baseado na detecção MPA em sistema FIA com eletrodo de BDD para determinação de VP e OX em amostras farmacêuticas, bem como o estudo da determinação desses compostos em amostras de urina na presença de AA e AU.

As vantagens encontradas no método proposto para determinação de VP frente ao método oficial e demais métodos da literatura são a alta frequência de análise (cerca de 50 injeções por hora, relativo baixo custo de aquisição e aplicação da técnica, simplicidade na realização das análises, pois dispensa etapas laboriosas de pré-preparo das amostras e utiliza um eletrodo sem modificação da sua superfície, alta precisão dos resultados e baixa geração de resíduos. A validação da metodologia foi realizada pelos estudos de adição e recuperação nas amostras farmacêuticas e de urina, apresentando resultados satisfatórios. O doseamento em amostras farmacêuticas também foi realizado e os resultados mostraram ser comparáveis aos do método oficial. Os LD foram satisfatórios para o emprego nas amostras estudadas e o método mostrou uma boa repetibilidade.

O mesmo método proposto foi desenvolvido para determinação da OX, mas utilizando diferentes condições eletroquímicas e de fluxo para ser aplicado em amostras farmacêuticas e urina. Os resultados mostraram também as mesmas características vantajosas supracitadas para o VP na aplicação em amostras farmacêuticas, restando ainda avaliar a resposta do fármaco frente ao aumento da concentração de AA e AU, mas os estudos realizados até então não mostram interferência significativa dos compostos na análise.

Outro ponto a ser destacado no trabalho é a possibilidade de análise de amostras de urina com a utilização de um eletrodo não modificado e sem separação prévia dos interferentes presentes nos fluidos, o que proporcionou maior simplicidade e rapidez nas análises para determinação do VP e a potencialidade para a determinação da OX em urina.

Portanto, neste trabalho foi mostrado que detecção MPA acoplada a sistemas FIA usando o eletrodo de BDD pode ser um método bastante viável para ser utilizado no controle de qualidade do VP e OX, bem como para outros fármacos eletroativos, principalmente, no caso dos fármacos de baixo índice terapêutico nas farmácias de manipulação. Além disso, o método proposto pode ser atrativo para análises de rotina em indústrias farmacêuticas, proporcionando uma análise mais econômica e ambientalmente mais sustentável.

Desta forma, existe a perspectiva de criação de um kit de análise para os vinte e dois fármacos da classe de baixo índice terapêutico, utilizando metodologias em fluxo com detecção MPA. Este projeto já está sendo executado pelo grupo de pesquisa do orientador deste trabalho. O kit de análise para esta classe de medicamentos pode gerar maior economia, rapidez, simplicidade das análises e menor geração de resíduos no controle de qualidade pelas indústrias e farmácias de manipulação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLHASANI, J.; HOSSEINIB, H.; KHANMIRIB, R. H. Electrochemical study and differential pulse voltammetric determination of oxcarbazepine and its main metabolite at a glassy carbon electrode. **Analytical Methods**, v.6, p. 850-856, 2014.

ALFARO, M. A.Q.; FERRO, S.; MARTINEZ-HUITLE, C. A.; VONG, Y. M. Boron doped diamond electrode for the wastewater treatment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 2, p. 227-236, 2006.

ALVES, G.; FIGUEIREDO, I.; CASTEL-BRANCO, M.; LOUREIRO A.; FALCÃO, A.; CARAMONA, M. Simultaneous and enantioselective liquid chromatographic determination of eslicarbazepine acetate, S-licarbazepine, R-licarbazepine and oxcarbazepine in mouse tissue samples using ultraviolet detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, p. 132-140, 2007.

ANVISA, **Farmacopeia Brasileira 5ª edição**, vol. 2, 2010, Brasília-DF: Anvisa 853.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº. 67**, 8 de Outubro de 2007.

Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_67_2007.pdf/>. Acesso em 25 jul. 2016.

APAYDIN, E. R.; SAGLIKOGU, G.; YILMAZ, S.; YILDIZ M. Sensitive Electrochemical Determination of Oxcarbazepine using Polymer Film Modified Glassy Carbon Electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 10, p. 1904 – 1915, 2015.

BASAVAIHAH, K.; RAJENDRAPRASAD, N.; CIJO, M. X.; VINAY, K. B.; RAMESH, P. J. Development and validation of stability indicating spectrophotometric methods for determination of oxcarbazepine in pharmaceuticals. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.70, p. 346-351, 2011.

BHAUMIK, U.; BOSE, A.; CHATTERJEE, B.; GHOSH, A.; SENGUPTA, P.; AGARWAL, S.; DAS, A.; PAL, T. K. Stability-Indicating HPLC Method for the Determination of Oxcarbazepine in Pharmaceutical Formulation. **Asian Journal of Chemistry**, v. 22, p. 2051-2057, 2010.

BOCATO, M. Z.; BORTOLETO, M. A.; PUPO, M. T.; de OLIVEIRA, A. R. M. A new enantioselective CE method for determination of oxcarbazepine and licarbazepine after fungal biotransformation. **Electrophoresis**, v. 35, p. 2877-2884, 2014.

BRETON, H.; COCIGLIO, M.; BRESSOLLE, F.; PEYRIERE, H.; BLAYAC, J. P.; HILLAIRES-BUYS, D. Liquid chromatography–electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 828, p. 80-90, 2005.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações**. Oxford University Press, 1996, v.5, p. 236-244, 416-418.

BRUNTON, L.; CHABNER, B.; KNOLLMAN, B. **Goodman & Gilman: The Pharmacological Basics of Therapeutics**. 12 ed. New York: McGraw-Hill, 2005.

CALVO, M. E. B.; RENEDO, O. D. M.; MARTÍNEZ, J. A. Determination of oxcarbazepine by Square Wave Adsorptive Stripping Voltammetry in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1156-1160, 2007.

CARREIRA, F.C. **Determinação de parabenos em antitranspirantes empregando voltametria sob eletrodo de diamante e cromatografia de alta eficiência**. Dissertação, Mestrado em Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2008.

CHEN, A.; TSAO, M.; CHUANG, J.; LIN, C. Electrochemical determination of Verapamil with a microchip embedded with gold nanoelectrode ensemble electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 89, p. 700- 707, 2013

CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA. **Dados 2015**. Disponível em: <[http://www.cff.org.br/pagina.php?id=801&menu=801&titulo=Dados+2015+](http://www.cff.org.br/pagina.php?id=801&menu=801&titulo=Dados+2015+>)>. Acesso em 27 jul. 2016.

CONTIN, M.; BALBONI, M.; CALLEGATI, E.; CANDELA, C.; ALBANI, F.; ROBERTO RIVA, BARUZZI, A. Simultaneous liquid chromatographic determination of lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in plasma of patients with epilepsy. **Journal of Chromatography B**, v. 828, p. 113-117, 2005.

de BARROS R. D. M.; RIBEIRO, M. C.; NA-SUMODJO, P. T.; JULIÃO, M. S. D.; SERRANO, S. H. P.; FERREIRA, N. G. Filmes de diamante CVD dopado com boro, Parte I: Histórico, produção e caracterização. **Química nova**, v. 28, p. 317-325 , 2005.

de MIRANDA, J. A. T; **Determinação de aspirina e ácido ascórbico em medicamentos usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2011.

DEMIRCAN, S.; KIR, S.; OZKAN, S. A. Electroanalytical Characterization of Verapamil and its Voltammetric Determination in Pharmaceuticals and Human Serum. **Analytical Letters**, v. 40, p. 1177-1195, 2007.

dos SANTOS, W. T. P.; GIMENES, D. T.; ANGNES, L.; RICHTER, E. M.; Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: Potencialidades e aplicações. **Química Nova**, v. 34, p. 1753-1761, 2011

dos SANTOS, W. T. P.; GIMENES, D. T.; ALMEIDA, E. G. N.; EIRAS, S. P.; ALBUQUERQUE, Y. D. T.; RICHTER, E. M.; Simple Flow Injection Amperometric System for Simultaneous Determination of Dipyrone and Paracetamol in Pharmaceutical Formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1249-1255, 2009.

ENÉAS, P. C. R.; de OLIVEIRA, R. B.; PIANETTI, G. A. Oxcarbazepine: validation and application of an analytical method. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 265- 272, 2010.

FORTUNA, A.; ALVES, G.; ALMEIDA, A.; LOPES, B.; FALCÃO, A.; da SILVA, P. S. A chiral liquid chromatography method for the simultaneous determination of oxcarbazepine, eslicarbazepine, R-licarbazepine and other new chemical derivatives BIA 2–024, BIA 2–059 and BIA 2–265, in mouse plasma and brain. **Biomedical Chromatography**, v. 26, p. 384-392, 2012.

GANDHIMATHI, M. RAVI, T. K. Use of Folin-Ciocalteu phenol reagent and 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazine hydrochloride in the determination of oxcarbazepine in pharmaceuticals. **Acta Pharmaceutica**, v. 58, p. 111-118, 2008.

GIMENES, D. T.; DOS SANTOS, W. T. P.; TOMIN, T. F.; MUNOZ, R. A. A.; RICHER, E. M. Flow-Injection Amperometric method for indirect determination of Dopamine in the presence of a large excess of Ascorbic acid. **Electroanalysis**, 2009.

GIMENES, D. T.; DOS SANTOS, W. T. P.; MUNOZ, R. A. A.; RICHER, E. M. Internal Standard in flow inject analysis with amperometric detection. **Electrochemistry Communications**, v.12, p. 216, 2010.

GIRARD, H.; SIMON, N.; BALLUTAUD, D.; HERLEM, M.; ETCHEBERRY, A. Effect of anodic and cathodic treatments on the charge transfer of boron doped diamond electrodes. **Diamond and Related Materials**. v.16, p. 316-325, 2007.

GRANGER, M. C.; SWAIN, M. G.; The influence of surface interactions on the reversibility of ferri/ferrocyanide at boron-doped diamond thin-film electrodes. **Journal of Electrochemical Society**, v.146, p.4551, 1999.

HAMIDIA, S.; JOUYBAN, A.; Capillary electrophoresis with UV detection, online stacking and off-line dispersive liquid-liquid microextraction for determination of verapamil enantiomers in plasma. **Analytical Methods**, v. 7, p. 5820-5829, 2015.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

HASSAN, S. S. M.; MAHMOUD, W. H.; ELMOSALLAMY, M. A. F.; ABDEL-SAMAD, M. S. Miniaturized Verapamil Solid-State Potentiometric Sensors Based on Native Ionic Polymers. **Mikrochimica Acta**, v. 131, p. 199-203, 1999.

HUBERT, P.; CROMMEN, J. HPLC Determination of Verapamil and Norverapamil in Plasma Using Automated Solid Phase Extraction for Sample Preparation and Fluorometric Detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 17, p. 2147-2170, 1994.

HUPERT, M.; MUCK, A.; WANG, R.; STOTTER, J.; CVACKOVA, Z.; HAYMOND, S.; SHOW, Y.; SWAIN, G. .M. Conductive diamonds thin-films in electrochemistry. **Diamond and Related Materials**, v. 12, p. 1940-1949, 2003.

IVANDINI, T. A.; RAO, T. N.; FUJISHIMA, A.; EINAGA, Y. Electrochemical oxidation of oxalic acid at highly boron-doped diamond electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 3467, 2006.

IVANOVA, V.; ZENDELOVSKA, D.; STEFOVA, M.; STAFILOV, T. HPLC method for determination of verapamil in human plasma after solid-phase extraction. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 1297-1303, 2008.

KASIM, E. A.; GHANDOUR, M. A.; EL-HATY, M. T.; AHMED, M. M. Determination of verapamil by adsorptive stripping voltammetry in urine and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 921-929, 2002.

KIMISKIDIS V.; SPANAKIS, M.; NIOPAS, I.; KAZIS, D.; GABRIELI, C.; KANAZE, F. I.; DIVANOGLU, D. Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for the determination of oxcarbazepine and its main metabolites in human plasma and cerebrospinal fluid and its application to pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 763-768, 2007.

KLYS, M.; ROJEK, S.; BOLECHALA, F. Determination of oxcarbazepine and its metabolites in postmortem blood and hair by means of liquid chromatography with mass detection (HPLC/APCI/MS). **Journal of Chromatography B**, v. 825, p. 38-46, 2005.

KUMPS, A. Simultaneous HPLC Determination of Oxcarbazepine, Carbamazepine and Their Metabolites in Serum. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 7, p. 1235-1241, 1984.

KUZMANOVIC, D.; STANKOVIC, D. M.; MANOJLOVIC, D.; KALCHER, K.; ROGLIC, G. Baicalein – main active flavonoid from *Scutellaria baicalensis* 0 voltammetric sensing in human samples using boron doped diamond electrode. **Diamond & Related Materials**, v. 58, p. 35-39, 2015.

LEVERT, H.; ODOU, P.; ROBERT, H. LC determination of oxcarbazepine and its active metabolite in human serum. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 517-525, 2002.

LIMA, A. B.; CHAVES, S. C.; DA SILVA, L. M.; RICHTER, E. M. SANTOS, W. T. P. Determinação de nimesulida por análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos. **Química Nova**, v. 36, p. 1296-1302, 2013.

MANDRIOLIA, R.; GHEDINIA, N.; ALBANIB, F.; KENNDLER, E.; RAGGIA, M. A. Liquid chromatographic determination of oxcarbazepine and its metabolites in plasma of epileptic patients after solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 783, p. 253-263, 2003.

MAZZUCHELLI, I.; FRANCO, V.; FATTORE, C.; MARCHISELLI, R.; PERUCCA, E.; GATTI, G. A NOVEL Enantioselective Microassay for the High-Performance Liquid Chromatography Determination of Oxcarbazepine and Its Active Metabolite Monohydroxycarbazepine in Human Plasma. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 29, p. 319-324, 2007.

MÉGARBANE, B.; KARYO, S.; ABIDI, K.; DELHOTAL-LANDES, B.; AOUT, M.; SAUDER, P.; FRÉDÉRIC J. Baud Predictors of Mortality in Verapamil Overdose: Usefulness of Serum Verapamil Concentrations. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 108, p. 385–389, 2010.

MENGE, G. P.; DUBOIS, J. P.; BAUER, G. Simultaneous determination of carbamazepine, oxcarbazepine and their main metabolites in plasma by liquid chromatography. **Journal of Chromatography Biomedical Applications**, v. 414, p. 477-483, 1987.

MENGE, G.; DUBOIS, J. P. Determination of oxcarbazepine in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography Biomedical Applications**, v. 275, p. 189-194, 1983.

MILENOVIĆ, D. M.; MILOŠEVIĆ, S. P.; ĐURIĆ, S. L.; NASKOVIĆ, D. Č.; MITIĆ, S. S. Development and Validation of an HPLC Method for the Determination of Verapamil Residues in Supports of Cleaning Procedure. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 68, p. 545-551, 2013.

MIRANDA, J. A. T.; CUNHA, R. R.; GIMENES, T. D.; MUNOZ, R. A. A.; RICHER, E. M. Determinação simultânea de ácido ascórbico e acetilsalicílico usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica pulsada. **Química Nova**, v. 37, p. 1459-1463, 2012.

NOIRFALISE, A.; COLLINGE, A. Quantitative determination of oxcarbazepine. **Journal of Chromatography Biomedical Applications**, v. 214, p. 417-420, 1983.

ORTUÑO, J. A.; SÁNCHEZ-PEDREÑO, C.; GIL, A. Flow-injection pulse amperometric detection based on ion transfer across a water-plasticized polymeric membrane interface for the determination of verapamil. **Analytica Chimica Acta**, v. 554, p. 172-176, 2005.

NOSAL-WIERCIŃSKA, A.; YILMAZ, S.; BINEL, S.; YAGMUR, S.; SAGLIKOGU, G.; SADIKOGLU, M.; YILDIZB, M. Electroanalytical and HPLC Methods for the Determination of Oxcarbazepine in Spiked Human Urine and Tablet Dosage Form. **Croatica Chimica Acta**, v. 87, p. 213-219, 2014.

OLIVEIRA, G. G.; AZZI, D. C.; VICENTINI, F. C.; SARTORI, E. R.; FATIBELLO-FILHO, R. Voltammetric determination of verapamil and propranolol using a glassy carbon electrode modified with functionalized multiwalled carbon nanotubes within a poly (allylamine hydrochloride) film. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 708, p. 73-79, 2013

PAGE, C.; CURTIS, M.; SUTTER, M.; WALKER, M.; HOFFMAN, B. **Farmacologia integrada**. 2 ed. Barueri: Manole, 2004.

PANIZZA, M.; CERISOLA, G. Application of diamond electrodes to electrochemical processes. **Electrochimica Acta**, v. 51, p. 191-199, 2005

PIENIMÄKI, P.; FUCHS, S.; ISOJÄRVI, J.; VÄHÄKANGAS K. Improved detection and determination of carbamazepine and oxcarbazepine and their metabolites by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 673, p. 97-105, 1995.

PLESKOV, Y. V. Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 55, p. 1045-1050, 2000.

QI, M. L.; WANG, P.; WANG, L. J.; FU, R. N. LC method for the determination of oxcarbazepine in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, p. 57-62, 2003.

RAHMAN, N.; HODA, M. N. Spectrophotometric determination of verapamil hydrochloride in drug formulations with chloramine-T as oxidant. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 374, p. 484-489, 2002.

Rahman, N.; khan, N. A.; Azmi, S. N. H. Optimized and Validated Spectrophotometric Methods for the Determination of Verapamil Hydrochloride in Drug Formulations. **Science Asia**, v. 31, p. 341-348, 2005.

RAJENDRAPRASAD, N.; BASAVAIHAH, K.; VINAY, K. B. Application of 3-methylbenzothiazolin-2-one hydrazone for the quantitative spectrophotometric determination of oxcarbazepine in pharmaceuticals with cerium(iv) and periodate. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 79, p. 616-625, 2012.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses. Part I. New concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.78, n.1, p.145-157, 1975.

SALAZAR-BANDA, G. R.; DE DARVALHO, A. E.; ANDRADE, L. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. On the activation and physical degradation of boron-doped diamond surfaces brought on by cathodic pretreatments. **Food Chemistry**, v. 20, p.1817-1827, 2010.

SEMAAN, F.S.; CAVALHEIRO, E. T. G.; BRETT, C. M. A. Electrochemical Behavior of Verapamil at Graphite-Polyurethane Composite Electrodes: Determination of Release Profiles in Pharmaceutical Samples. **Analytical Letters**, v. 42, p. 1119-1135, 2009.

SCHACHTER, S. C. Oxcarbazepine: current status and clinical applications. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 8, p.1103-1112, 1999.

SOUPPART, C.; DECHERF, M.; HUMBERT, H.; MAURER, G. Development of a high throughput 96-well plate sample preparation method for the determination of trileptal (oxcarbazepine) and its metabolites in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 762, p. 9-15, 2001.

SUFFREDINI, H. B.; PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; MACHADO, S. A. S.; FILHO, R. C. R.; AVACA, L. A. Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pré-tratment. **Electrochimica Acta**, v. 49, p. 4021-4026, 2004.

TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. **Eletroquímica**. 2. ed. São Paulo: Editora Da Universidade de São Paulo, 2005. 220 p.

VALVO, L.; ALIMENTI, R.; ALIMONTI, S.; RAIMONDI, S.; FOGLIETTA, F.; CAMPANA F. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of related substances in verapamil hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 989-996, 1997.

VARON, S.; MARÍÑO, D. Determination of verapamil through LC-ESI-MS/MS in a case of fatal intoxication. **Case Reports**, v. 1, p. 26-32, 2015.

WANG, J. Analytical Electrochemistry. 3 ed. New jersey: John Wiley e Sons, 2006.
YAGI, I.; NOTSU, H.; KONDO, T.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. Electrochemical selectivity for redox systems at oxygen-terminated diamond electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 473, p.173, 1999.